

**Indolische Sekundärmetabolite in *Isatis tinctoria* L.–
Hautpenetration von Tryptanthrin und saisonale
sowie prozessbedingte Veränderungen der
Inhaltsstoffmuster**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt der Biologisch – Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich – Schiller – Universität Jena

von Apothekerin Diplom – Pharmazeutin Christine Oberthür
geboren am 18. November 1975 in Erfurt

Gutachter:

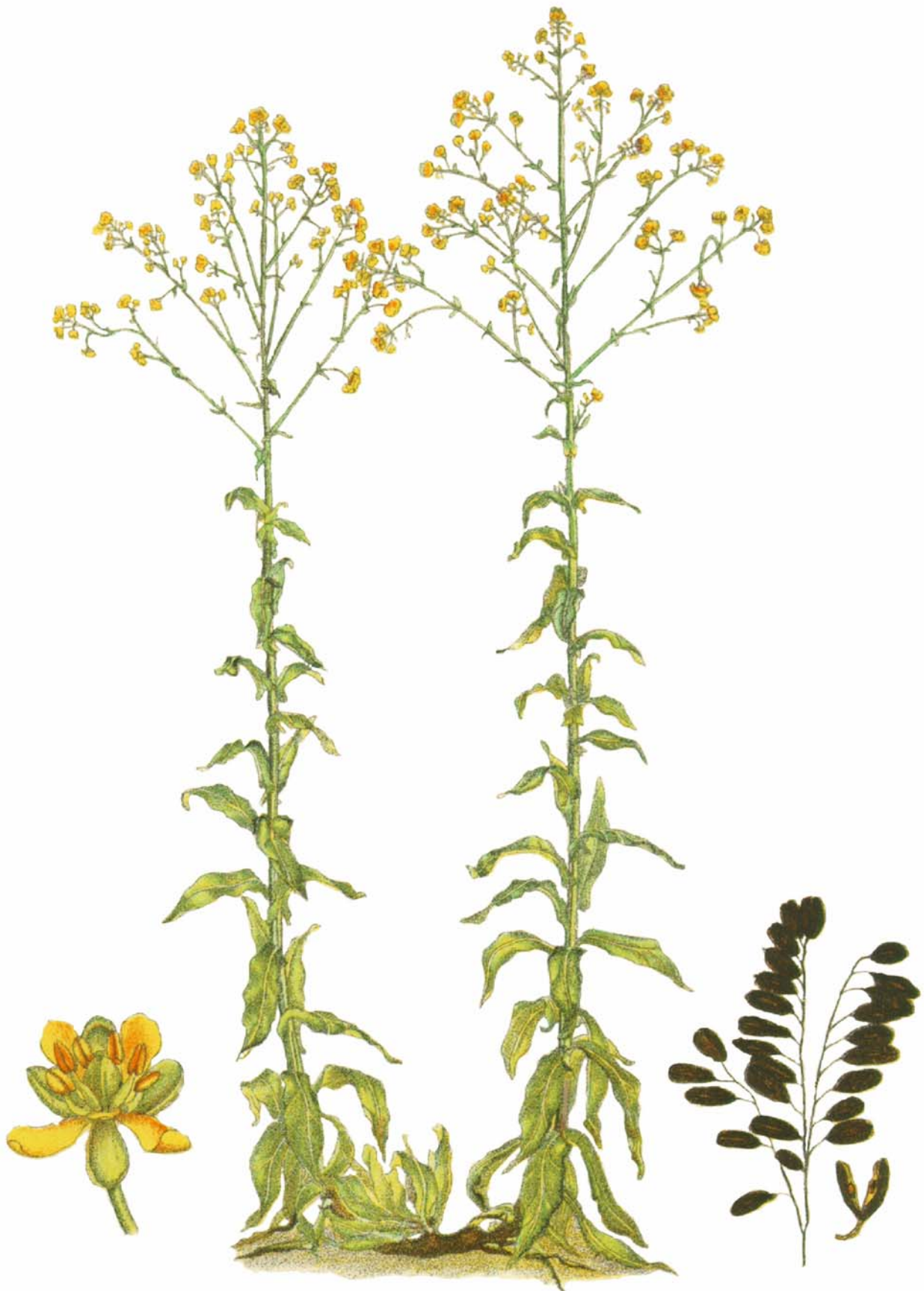
1. Prof. Dr. M. Hamburger
2. Prof. Dr. G. Scriba
3. Prof. Dr. H. Stuppner (extern)

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Mai 2004

Tag der öffentlichen Verteidigung: 23. Juni 2004

Jena, den 04. April 2004

Meinen Eltern



Isatis tinctoria L.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Matthias Hamburger für die Übertragung dieses interessanten Themas und für zahlreiche Hilfestellungen sowie Ideen zu praktischen und theoretischen Aspekten dieser Arbeit recht herzlich bedanken.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Universität Jena danke ich für ihre Unterstützung und das schöne Arbeitsklima. Besonderer Dank gilt Frau Dr. Barbara Schubert für ihre Hilfe bei der Bearbeitung der Waidblattproben und Frau Heidemarie Graf für ihre Mithilfe bei der Isolierung der Indigovorstufen. Ebenso sei Herrn Bernhard Hoffmann für die Unterstützung bei der Ausführung der Tryptanthrinsynthesen gedankt. Erwähnt sei auch die Hilfe bei technischen Problemen an der HPLC-MS Anlage durch Herrn Uwe Beck, Herrn Sven Adler und Herrn Dr. Rainer Wegner.

Frau Dr. Kathrin Dittmann, Frau Dr. Ulrike Riese, Herrn Friedemann Gaube und Herrn Georg-Ulrich Rüster danke ich für die angenehme Zusammenarbeit in den Praktika.

Die Aufklärung der Strukturen von Isatan A/B wurde in Kooperation mit dem Max-Planck Institut für Chemische Ökologie Jena, ausgeführt. Für die Ausführung der NMR-Messungen und die Hilfe bei der Strukturaufklärung bin ich Herrn Dr. Bernd Schneider verbunden.

Für die Einführung in die Grundlagen der Mikrodialyse, die Bereitstellung der Ausrüstung für die Hautpenetrationsstudie und die nette Zusammenarbeit möchte ich Herrn Dr. Christian Heinemann, Hautklinik Jena, danken.

Die Testungen der Mikrofraktionen von *Isatis tinctoria* L. im 5-Lipoxygenase-Bioassay wurde durch die Firma Vitaplant, Witterswil, Schweiz durchgeführt. Dafür sei Herrn Dr. Rene Jäggi und Mitarbeitern gedankt.

Frau Biertümpfel und Herrn Dr. Vetter, Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft Dornburg, danke ich für die Bereitstellung der Waidproben (Anbau und Ernte der Waidherkünfte).

Herrn Prof. Dr. Gerhard Jahreis und Mitarbeitern, Institut für Ernährungswissenschaften, danke ich für die GC-MS- Messungen zur Bestätigung der α -Linolensäure-Struktur.

Zum Schluss möchte ich mich vor allem bei meinen Eltern für ihre Liebe und Unterstützung bedanken, die mir jederzeit Kraft für diese Arbeit gegeben hat. Auch meinen Freunden, insbesondere Anja und Stefan Senitz sowie Sandra Schwabe sei für die schöne Zeit in Jena gedankt.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	12
1.1.	Ziel der Arbeit.....	12
1.2.	Überblick über die verwendeten Methoden.....	13
1.3.	Der Färberwaid (<i>Isatis tinctoria</i> L.).....	14
1.3.1.	Systematik und Vorkommen.....	14
1.3.2.	Inhaltsstoffe.....	15
1.3.3.	Waid als Färberpflanze.....	18
2.	Das anti-inflammatorische Potential von <i>Isatis tinctoria</i> L.	19
2.1.	Traditionelle Verwendung.....	19
2.2.	Erforschung der anti-inflammatorischen Aktivität in Bioassay-Systemen.....	20
2.3.	Pharmakologische Untersuchungen <i>in vivo</i>	20

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.	Untersuchung der Hautpenetration von Tryptanthrin mit Mikrodialyse....	23
3.1.	Aufbau der Haut und Diffusionswege.....	23
3.2.	Voraussetzungen für die Diffusion durch die Haut.....	24
3.3.	Methoden zur Untersuchung der Hautpenetration einer Substanz.....	25
3.4.	Hautmikrodialyse.....	25
3.5.	Hautmikrodialyse mit tierischer Haut (Schweinehautmodell).....	27
3.5.1.	Ermittlung der <i>in vitro</i> Recovery von Tryptanthrin an Cuprophan®	27
3.5.2.	Aufbau des Mikrodialyse-Experimentes am Schweinehautmodell.....	28
3.6.	Entwicklung der HPLC-MS-Analytik.....	29
3.6.1.	Voraussetzungen und Problematik.....	29
3.6.2.	Herstellung des internen Standards d ₈ -Tryptanthrin durch Synthese.....	31
3.6.3.	Validierung der HPLC-MS-Methode.....	32
3.7.	Hautpenetration von Tryptanthrin.....	34
3.8.	Abschätzung der Gewebespiegel von Tryptanthrin.....	38
3.9.	Zusammenfassung.....	39

4.	Identifizierung eines weiteren Inhibitors der 5-Lipoxygenase.....	41
4.1.	Mikrofraktionierung.....	41
4.2.	Ergebnis der Mikrofraktionierung.....	44
5.	Schlussfolgerungen zu den Ergebnissen der Mikrodialyse und zur Identifizierung der α-Linolensäure als Inhibitor der 5-Lipoxygenase	45
6.	Untersuchung des Gehaltes an indolischen Komponenten in den Extrakten von <i>Isatis tinctoria</i> L. in Abhängigkeit von Erntezeitpunkt und Nacherntebehandlung.....	48
6.1.	Anbau, Züchtung und Ernte verschiedener Waidherkünfte.....	48
6.2.	Quantifizierung von Tryptanthrin in Extrakten von <i>Isatis tinctoria</i> L.	50
6.2.1.	Analytik.....	50
6.2.2.	Quantifizierung von Tryptanthrin.....	50
6.3.	Quantifizierung von Indigoprecursoren in methanolischen <i>Isatis</i> – Extrakten....	54
6.3.1.	Entdeckung neuer Precursoren durch Dünnschichtchromatographie.....	54
6.3.2.	Isolierung und Strukturaufklärung von Isatan A und Isatan B.....	57
6.3.3.	Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung von Isatan A, Isatan B und Indican.....	65
6.4.	Untersuchung der Extrakte auf den Gehalt an Indigoprecursoren in Abhängigkeit von Erntezeitpunkt und Nacherntebehandlung.....	72
6.4.1.	Gehalt an Isatan A und Isatan B.....	72
6.4.2.	Gehalt an Indican.....	73
6.5.	Zusammenfassung.....	74
7.	Diskussion.....	76
7.1.	Überlegungen zur Biogenese der Indoxylderivate.....	77
7.2.	Ausblick.....	81

MATERIALIEN UND METHODEN

8.	Pflanzenmaterial.....	84
9.	Nacherntebehandlung.....	85
10.	Extraktionen.....	86
10.1.	Beschleunigte Lösungsmittlextraktion (ASE).....	86
10.2.	Extraktion mit überkritischen Gasen (SFE).....	87
10.3.	Turbomazeration.....	87
11.	Synthesen.....	88
11.1.	Tryptanthrin.....	88
11.2.	Deuteriertes Tryptanthrin.....	89
12.	Mikrodialyse.....	92
12.1.	Herstellung einer Mikrodialyse – Sonde.....	92
12.2.	Herstellung der Testlösungen.....	92
12.3.	Verlegung der Mikrodialysemembranen in der Haut.....	93
12.4.	Mikrodialyse und Probengewinnung.....	94
12.5.	Herstellung der Kalibrierlösungen und der internen Standardlösung.....	94
12.6.	Probenvorbereitung für die HPLC – Injektion.....	95
12.7.	Analyse der Dialysate.....	95
12.8.	Ermittlung der Membrantiefe in der Haut.....	96
12.9.	Ermittlung der <i>in vitro</i> Recovery.....	96
13.	Mikrofraktionierungen und Bioassays.....	97
13.1.	Mikrofraktionierungen.....	97
13.2.	Bioassays.....	98
13.2.1.	Inhibition der 5 – Lipxygenase (5 – LOX).....	98
13.2.2.	Bestimmung der Chinonreduktase – Aktivität (QR – Induktion).....	98
13.2.3.	Bestimmung der Hemmwirkung auf die CYP 1a – Aktivität.....	99

14. Chromatographische Methoden.....	100
14.1. Dünnschichtchromatographie.....	100
14.2. Präparative Säulenchromatographie.....	103
14.2.1. Trennung auf Kieselgel 60.....	103
14.2.2. Aufreinigung über Sephadex® LH-20.....	104
14.3. HPLC (Hochleistungsflüssigchromatographie).....	106
15. Massenspektroskopische Methoden.....	109
15.1. Allgemeine Methode zur Bestimmung unbekannter Massen.....	109
15.2. Quantifizierung von Tryptanthrin.....	109
15.3. Bestimmung der Masse der Indigoprecursoren über Infusion.....	110
16. Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen.....	111
16.1. Bestimmung des Schmelzpunktes.....	111
16.2. Aufnahme von IR – Spektren.....	111
16.3. Aufnahme von UV/VIS – Spektren.....	111
16.4. Optische Drehung.....	112
16.5. Strukturaufklärung mit NMR.....	112
17. Analytik zur Bestimmung des Gehaltes an Isatan A, Isatan B, Indican und Tryptanthrin.....	113
17.1. Densitometrie.....	113
17.2. Quantifizierung von Tryptanthrin in Extrakten.....	114
18. Enzymatische Hydrolysen.....	116
19. Geräte, Chemikalien, Materialien.....	117
19.1. Allgemeine Laborgeräte.....	117
19.2. Chromatographische und spektroskopische Geräte.....	118
19.3. Laufmittel / Lösungsmittel.....	119
19.4. Chemikalien.....	119
19.5. Referenzsubstanzen.....	120
19.6. Enzyme.....	120
19.7. Adsorbentien und sonstige Materialien.....	121

20. Summary.....	122
21. Literaturverzeichnis.....	125
Abkürzungsverzeichnis.....	139
Bildnachweis.....	142
Liste wissenschaftlicher Beiträge.....	143
Anhang.....	146
Lebenslauf.....	163
Selbstständigkeitserklärung.....	164

Einleitung

1. Einleitung

1.1. Ziel der Arbeit

Die Aufgabe der Dissertation bestand darin, die Einflüsse saisonaler und prozessbedingter Veränderungen auf das Inhaltsstoffmuster indolischer Sekundärmetabolite des Färberwaid, (*Isatis tinctoria* L.) zu erforschen.

Besonderes Interesse galt dabei dem Alkaloid Tryptanthrin, das in früheren Arbeiten als pharmakologisch wirksame Verbindung mit hemmender Aktivität auf Enzyme der Arachidonsäurekaskade (COX-2 / 5-LOX) (Danz et al. 2002b) und der induzierbaren NO-Synthase (Ishihara et al. 2000) identifiziert worden war. Daraufhin war ein erstes Screening mit 67 Waidproben aus aller Welt initiiert worden, bei dem große Unterschiede im Tryptanthringehalt festgestellt wurden (Danz et al. 2002a). Aus diesen Ergebnissen ergaben sich zwei Teilaufgaben dieser Arbeit. Zum einen sollte der Einfluss von Erntezeit und Trocknungsbedingungen nach der Ernte auf den Tryptanthringehalt anhand ausgewählter Waidherkünfte überprüft werden, zum anderen sollten Hinweise zur Bildung dieses Alkaloids erhalten werden. Parallel dazu wurden daher die gesammelten Waidproben auch auf den Gehalt an Indoxylderivaten (Indigovorstufen) untersucht, die mögliche Precursoren für Tryptanthrin darstellen. Daraus entwickelten sich die folgenden Schwerpunkte:

1. Weiterentwicklung der HPLC-MS Analytik für die Quantifizierung von Tryptanthrin unter Nutzung eines internen Standards, Verbesserung der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze der Methode und Erhöhung des Probendurchsatzes,
2. Herstellung eines deuterierten internen Standards für die HPLC-MS-Analytik,
3. Sammlung von Blattproben in verschiedenen Erntemonaten und Trocknung dieser Proben unter verschiedenen Bedingungen,
4. Entwicklung einer Analytik für die Gehaltsbestimmung der Indoxylderivate,
5. Isolierung der Indigovorstufe Isatan B (da kommerziell nicht erhältlich) für die Analytik der Indoxylderivate, Charakterisierung und Strukturüberprüfung von Isatan B
6. Gehaltsbestimmung der Indoxylderivate und Tryptanthrin in den gesammelten und getrockneten Waidblättern.

Zusätzlich zu den Untersuchungen der Inhaltsstoffmuster wurden zwei weitere, pharmakologisch orientierte Teilaufgaben in die Arbeit aufgenommen. Diese widmen sich einerseits der Hautpenetration von Tryptanthrin und andererseits der Identifizierung weiterer 5-Lipoxygenase inhibierender Verbindungen im Waidextrakt. Der Anlass für die Untersuchung der Hautpenetration von Tryptanthrin waren Ergebnisse pharmakologischer Studien an tierischen Entzündungsmodellen und die Resultate einer Probandenstudie an der Hautklinik Jena (Heinemann et al. 2004). In beiden Studien, in denen Tryptanthrin im Vergleich zum Waidextrakt getestet wurde, stellte sich heraus, dass das reine Alkaloid Tryptanthrin trotz höherer Konzentrationen im Vergleich zum *Isatis*-Extrakt nach topischer oder oraler Applikation geringer oder nicht signifikant (Probandenstudie Hautklinik) wirksam war (s. Kap. 2.3., Kap. 5.). Um diese Ergebnisse zu verstehen und erklären zu können, sollte die Hautpenetration von Tryptanthrin *ex vivo* durch Hautmikrodialyse am Modell untersucht werden (s. Kap. 3.).

Die Basis für die Suche nach weiteren 5-LOX hemmenden Extraktkomponenten sind in den Ergebnissen des Extraktscreenings an anti-inflammatorischen Zielen (s. Kap. 2.2.) begründet (Danz et al. 2001 und 2002b).

In diesem Extraktscreening, bei dem Tryptanthrin als dualer COX-2 / 5-LOX Inhibitor identifiziert worden war, zeigte sich, dass die Aktivität des Extraktes gegen die 5-Lipoxygenase nur zu einem Teil durch Tryptanthrin hervorgerufen wird (Hamburger 2002). Weitere Extraktstoffe, die ebenfalls die 5-Lipoxygenase zu hemmen vermögen, sollten zur Vervollständigung der Ergebnisse identifiziert werden (s. Kap. 4.).

1.2. Überblick über die verwendeten Methoden

In dieser Arbeit kamen vielfältige Methoden zum Einsatz. Die Gewinnung der Extrakte erfolgte meist durch beschleunigte Lösungsmittlextraktion oder durch Turbomazeration (s. Kap. 10.1.). Die Quantifizierung von Tryptanthrin in Extrakten (s. Kap. 6.2.) oder Dialysaten (s. Kap. 3.6.), ein Schwerpunkt dieser Arbeit, wurde durch die Nutzung der Hochdruckflüssigchromatographie, gekoppelt über eine Turbo-Ionspray-Quelle an ein Single Quadrupol-Massenspektrometer (HPLC-ESI-MS) ermöglicht. Dabei wurde durch Miniaturisierung (kurze HPLC-Säule), Einsatz des internen Standards *d*₈-Tryptanthrin (s. Kap. 3.6.2.) und Messung im Single Ion Mode (SIM) (massenspektroskopische Detektion) die

Sensitivität der Methode im Vergleich zur externen Standardmethode erhöht. Zur Quantifizierung der Indigovorstufen wurde eine Methode entwickelt, bei der die Indoxylderivate in einer Kombination von dünn-schicht-chromatographischer Auftrennung und densitometrischer Auswertung erfasst werden konnten. Die Nutzung der HPLC mit DAD-Detektion für die Gehaltsbestimmung der Indigovorstufen war nicht möglich (s. Kap. 6.3.3.). Zur Isolierung von Isatan A und Isatan B kam die präparative Säulenchromatographie an Kieselgel 60 und Sephadex[®] LH-20 zum Einsatz (s. Kap. 6.3.2.).

Die aktivitätsbezogene Mikrofraktionierung zur Identifizierung der 5-LOX-inhibierenden Komponente im Waidextrakt (s. Kap. 4.) wurde an einer analytischen HPLC-Anlage durchgeführt. Für die Hautpenetrationsstudie wurde die kutane Mikrodialyse, eine neue dermatologische Methode zur Erforschung der Penetration von Substanzen in die Haut, genutzt (s. Kap. 3.).

1.3. Der Färberwaid (*Isatis tinctoria* L.)

1.3.1. Systematik und Vorkommen

Der Färberwaid, *Isatis tinctoria* L., ist eine zweijährige Pflanze aus der Familie der Kreuzblütengewächse (Brassicaceae). Während in der ersten Vegetationsperiode zunächst eine dichte Blattrosette ausgebildet wird, folgt im zweiten Jahr ein bis zu 1,2 m hoher Spross, der zunächst gelbe Blüten (Mai-Juni) und später einsamige, tiefviolett bis schwarz gefärbte Früchte (Schötchen) trägt (Rothmaler 1994). Die Ansprüche des Färberwaid an Klima und Boden sind relativ gering, dies hat die flächendeckende Ausbreitung der Pflanze vom Kaukasus bis nach Europa, Asien (China, Japan) und Nordafrika gefördert. So ist der Färberwaid an Wegen, Feldrainen oder Steinbrüchen zu finden. Dennoch bevorzugt der Waid ein warmtrockenes Klima und nährstoffreiche Kalksteinböden. Aufgrund geeigneter klimatischer Verhältnisse im Thüringer Becken und der Bodenbeschaffenheit (Muschelkalk mit Lößauflage) fand der Färberwaid in Thüringen ideale Wachstumsvoraussetzungen.

Zur Gattung *Isatis* gehören auch *Isatis glauca* L. und *Isatis indigotica* FORT. Der chinesische Waid (*I. indigotica*) wurde zunächst als Varietät von *I. tinctoria* angesehen (Index Kewensis, 1997). Neuere Ergebnisse zeigen jedoch, dass *I. tinctoria* und *I. indigotica* zwei verschiedene Arten sind. *I. glauca* besitzt eine größere Verwandtschaft zu *I. tinctoria* (Gilbert et al. 2002).

1.3.2. Inhaltsstoffe

Die Gattung *Isatis* ist eine sehr vielfältige Quelle für Sekundärmetabolite, insbesondere für indolische Verbindungen. Über 100 Naturstoffe wurden bereits durch verschiedene Arbeitsgruppen identifiziert, die meisten Verbindungen wurden in den letzten 20-30 Jahren entdeckt. Durch die historische Verwendung als Färberpflanze gab es schon immer ein sehr großes Interesse an der Aufklärung der natürlichen Indigovorstufen und der Strukturen der farbbildenden Pigmente. Die Forschungen dazu reichen bis in das 19. Jahrhundert zurück. So beschrieb Schunck 1855 erstmals das Indican (**1**) (s. Abb. 1.3.2.1.a) als Farbvorstufe und dessen Struktur wurde 1900 durch Hoogewerff und ter Meulen in *Indigofera* als Indoxyl- β -D-glucosid aufgeklärt. Beijerinck erkannte zu gleicher Zeit jedoch, dass im Färberwaid nicht das Indican für die Indigobildung verantwortlich ist. 1967 wurde diese Annahme durch Epstein et al. bestätigt und für Isatan B zunächst das Indoxyl-5-ketogluconat als Struktur angenommen, obwohl die Ketogluconsäure als Metabolit nur in Mikroorganismen (Buchanan et al. 1974) oder als Precursor für die (+)-Tartarsäure in *Pelargonium* (Saito et al. 1984) bekannt war. Bis zum heutigen Zeitpunkt war die von Epstein et al. (1967) postulierte Struktur für Isatan B als richtig angenommen worden und die eindeutige Identifizierung mit heutigen Methoden (NMR) blieb aus. In dieser Arbeit (s. Kap. 6.3.) konnte nun Isatan B neben dem Haupt-Precursor Isatan A, erstmalig rein isoliert und mit NMR eindeutig identifiziert werden.

Weitere indolische Verbindungen sind u.a. das gelb-orange gefärbte Isatin (**2**) (Guo und Chen 1986) und die farbigen Pigmente (s. Abb. 1.3.2.1.b) (trans-) Indigo (**3**), (trans-) Indirubin (**4**) einschließlich der Isomeren cis-Indigo (**5**) und cis-Indirubin (**6**) sowie des braunen Isoindigos (**7**) (Perkin und Bloxam 1907, Perkin 1907, Maugard et al. 2001). Die Bestimmung der Indigogehalte in verschiedenen Blattproben war ebenfalls Bestandteil einiger Arbeiten (Berkeley 1961, Strobel und Gröger 1989, Kokobun et al. 1998).

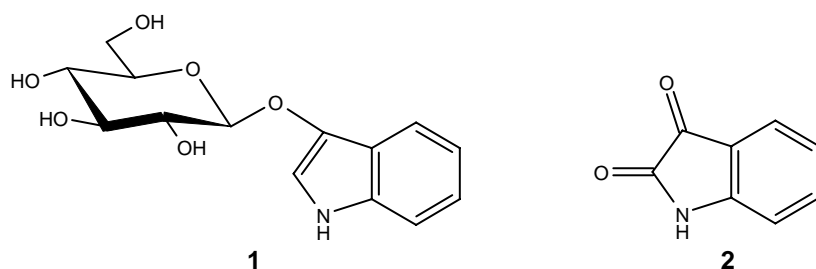


Abb. 1.3.2.1.a: Struktur von Indican (**1**) und Isatin (**2**)

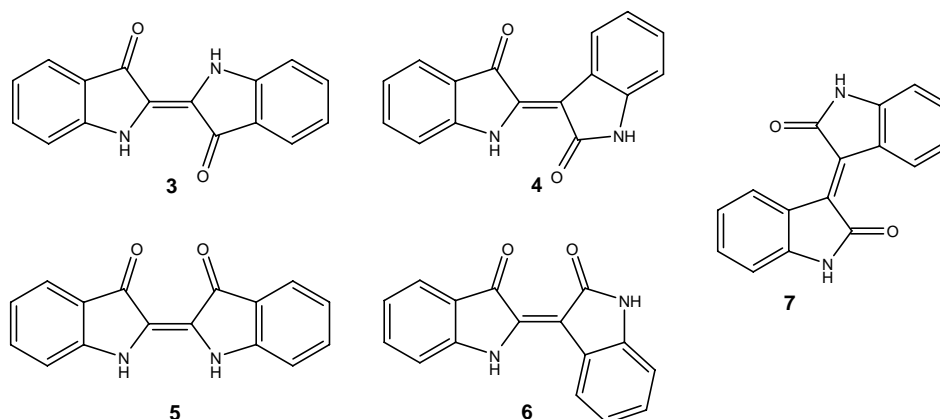


Abb. 1.3.2.1.b: Strukturen der Farbpigmente

Desweiteren sind eine Vielzahl von Alkaloiden, u.a. das Tryptanthrin (**8**) (Honda et al. 1980), das Deoxyvasicinon (**9**), das Isaindigoton (**10**), das Isaindigotidion (**11**) (Wu et al. 1997a) neben Chinazolinen (**12**, **13**), Indolin-2-on (**14**) und einem Benzodiazepinderivat (**15**) (Wu et al. 1997b) beschrieben worden. Bei vielen Verbindungen ist der indolische Grundkörper in der Struktur noch gut erkennbar (s. Abb. 1.3.2.2.).

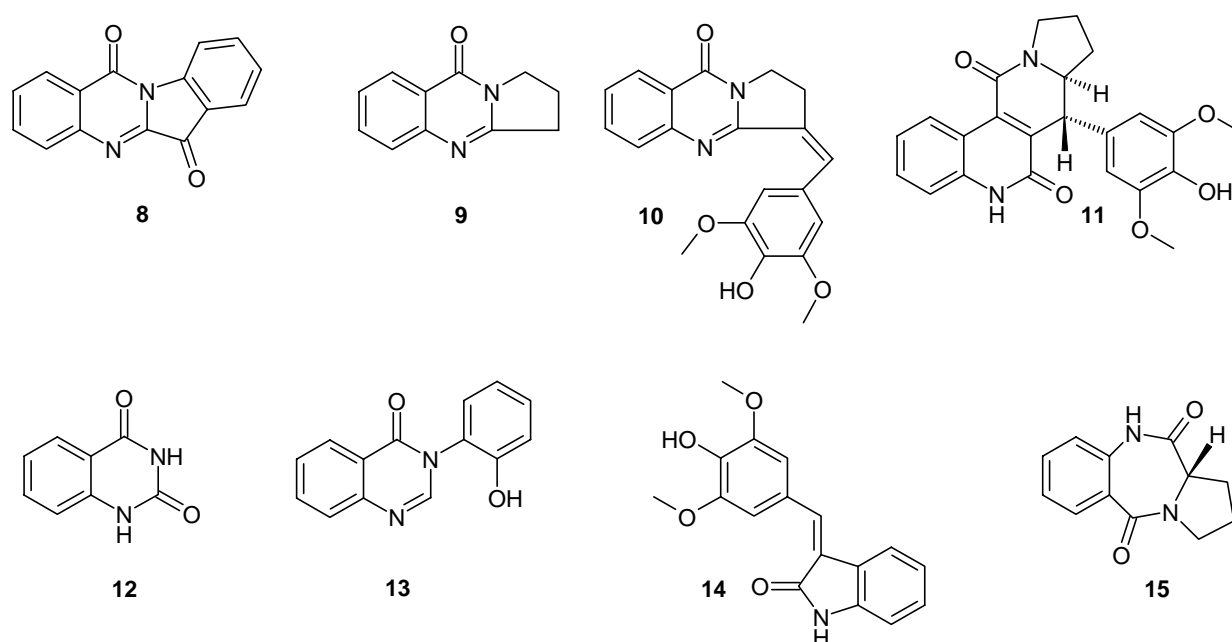


Abb. 1.3.2.2.: Alkaloide aus der Gattung *Isatis*

Ein weiteres chemotaxonomisches Merkmal für *Isatis* ist das Vorkommen von Glucosinolaten und Myrosinzellen. Diese sind typisch für die Familie der Brassicaceae bzw. für die Ordnung der Capparales (Kapernstrauchartige) (Rothmaler 1994). Da *Isatis* eine reiche Quelle für Indolverbindungen darstellt, findet man bei den Glucosinolaten (s. Abb. 1.3.2.3.) auch indolische Strukturen wie z.B. das Glucobrassicin (**16**) wieder. Aber auch aliphatische Glucosinolate wie Glucoraphanin (**17**) und Progoitrin (**18**) sind gefunden worden (Goetz und Schraudolf 1983, Lockwood und Belkhiri 1991, Frechard et al. 2001).

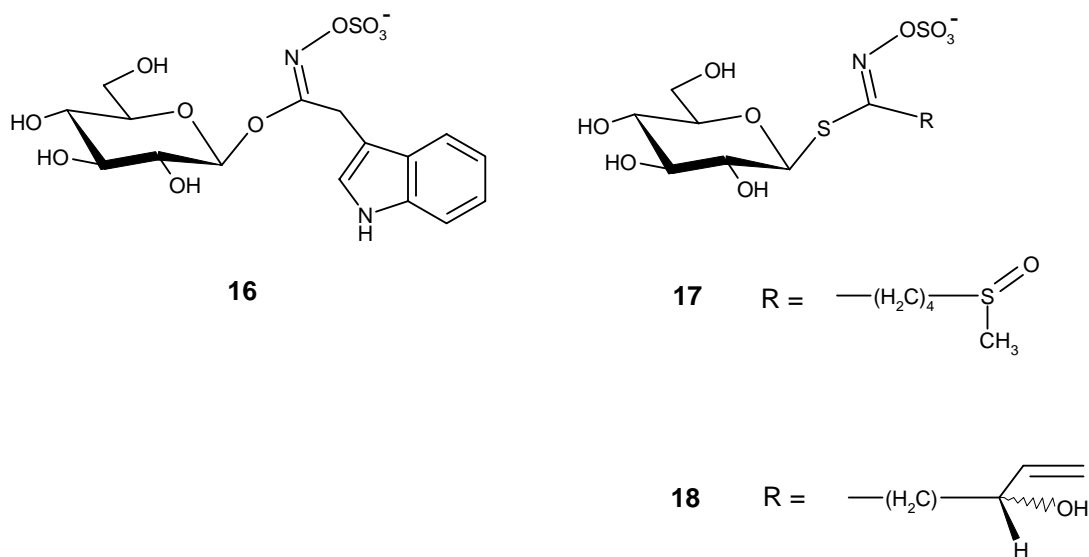


Abb. 1.3.2.3.: Glucosinolate in *Isatis*

Eine Reihe von weiteren indolischen Verbindungen (Intermediate des Indolstoffwechsels) wie Indol-3-carbonsäure, Indol-3-essigsäure und Indol-3-acetonitril sowie aromatische und aliphatische Carbonsäuren (v.a. Fettsäuren, Bsp. α -Linolensäure, s. Kap. 4) konnten neben Glykosiden, Isoprenoiden und Aminosäuren (Hartleb und Seifert 1994 und 1995, Zhu 1998) nachgewiesen werden. Außerdem ist *Isatis* reich an Flavonoiden, Beispiele dafür sind das Isoscoparin (Raynaud und Prum 1980), das Isoorientin und Quercetin sowie Linarin und Homovitexin (Wu et al. 1997b).

1.3.3. Waid als Färberpflanze

Eine große wirtschaftliche Bedeutung erlangte der Waid als Färberpflanze. Bereits um 750 brachten Slawen den Waid nach Europa. Doch erst ab dem 12. Jahrhundert begann der flächendeckende Anbau für die Gewinnung von Indigo. In Italien (Toskana), Frankreich (Toulouse), England (Somerset, Lincolnshire) und Deutschland (Thüringen, Jülich) wurde der Waid angebaut. Besonders in Thüringen brachte der Anbau dieser Färberpflanze neben der Weberei und dem Tuchgewerbe der Bevölkerung für vier Jahrhunderte Verdienst und Wohlstand. Schon damals wurde der Thüringer Waid wegen seiner hohen Färbekraft und sehr guten Qualität geschätzt und dem Waid anderer Anbauggebiete (Jülich, Nürnberg) vorgezogen. Um 1600 zählte man ca. 300 thüringische Dörfer, in denen Waidanbau betrieben wurde. Das Handelsmonopol hatten die sogenannten Waidstädte (Erfurt, Gotha, Arnstadt, Bad Langensalza) inne. Nur den Waidjunkern war es erlaubt, mit Waid zu handeln.

Ab 1500 erstarkte der Handel mit Ostindien und billigere Indigopflanzen (*Indigofera suffruticosa* Mill.) konnten eingekauft werden. Zahlreiche Handelsgesetze, die den Import preiswerter Indigopflanzen einschränken sollten, konnten den Niedergang der Waidproduktion in Europa nicht mehr aufhalten. Der 30-jährige Krieg (1618-1648) führte vor allem in Thüringen zu einem Einbruch in Waidhandel und -produktion.

Das endgültige Aus für die Indigoherstellung aus pflanzlichen Quellen kam durch die synthetische Indigoproduktion ab 1897 durch Baeyer.

Verarbeitung des Färberwaides

Sofort nach der Ernte wurden die Waidblätter in großen geflochtenen Körben im Flusswasser gewaschen, anschließend zu Waidmus mit Hilfe von Mühlensteinen zerkleinert (Waidmühlen) und einer spontanen ersten Gärung über mehrere Tage unterworfen. Dabei werden die Indigovorstufen durch die Einwirkung vorwiegend bakterieller Exoenzyme (β -D-Glucosidasen) in Indoxyl und Zucker gespalten (Meyer 1995). Freies Indoxyl reagiert durch den Luftsauerstoff zu Indigo.

Die aus der angegorenen Masse geformten Waidbälle lagerten zur Trocknung auf Horden. In dieser Form kam der Waid in den Handel. Am Bestimmungsort wurden die trockenen Waidbälle mit Waidhämmern zerschlagen und in Bottichen mit Wasser und Urin einer zweiten Gärung unterworfen. Aufgrund des Geruches durfte dieser Arbeitsschritt nur vor den

Toren einer Stadt ausgeführt werden. Hierbei wird das beim Zerkleinern der Waidblätter nach der Ernte entstandene, schwer lösliche Indigo in seine farblose, gut wasserlösliche Leukoform durch auf den Waidblättern lebende Bakterien (*Clostridium isatidis*) reduktiv überführt (Padden et al. 1999). Dieser Fermentationsschritt erforderte viel Erfahrung und Zeit, denn *Clostridium isatidis* benötigt für die Reduktion des Indigos spezielle Bedingungen, u.a. Temperaturen um die 50°C (thermophil), Polysaccharid-Quellen als Nahrung (Kleie-Zusatz) sowie alkalische Zusätze (Kalk) zur Abpufferung der bei der Gärung freiwerdenden Säuren (Padden et al. 1998). Diese reduzierte, lösliche Leukoform verteilt sich im Färbebad gleichmäßig auf die Faser und wird durch Luftoxidation wieder in Indigo überführt.

2. Das anti-inflammatorische Potential von *Isatis tinctoria* L.

2.1. Traditionelle Verwendung

Die heilende Wirkung dieser Pflanze war sowohl in der europäischen als auch in der chinesischen Medizin seit Jahrhunderten bekannt. Die Nutzung des Waids gegen Geschwüre, Wunden und Hämorrhiden wurde schon von Hippokrates (460 v. Chr.), Galenius oder Plinius dem Älteren (23-79 n. Chr.) beschrieben. Auch im späten Mittelalter wird der Gebrauch bei Milz- und Wundleiden oder Schlangenbissen erwähnt (Hurry 1930). Nachdem der Waid seine Bedeutung als Färberpflanze durch die Einfuhr billigerer Indigopflanzen in Europa verlor, gerieten auch seine heilenden Eigenschaften in Vergessenheit.

In der traditionellen chinesischen Medizin wird der Waid (*Isatis indigotica* FORT.) auch heute noch als Stammpflanze für 3 Monografien im Chinesischen Arzneibuch geführt (*Isatidis folium*, *Isatidis radix*, *Indigo naturalis*).

Interessant ist, dass trotz des geografischen Unterschiedes ähnliche Anwendungsbereiche für den Waid existieren. So findet diese Heilpflanze auch in der traditionellen chinesischen Medizin Verwendung bei Entzündungen, Fieber, Schwellungen, Exanthemen oder Karbunkel (Tang und Eisenbrand 1992, Zhu 1998). Zusätzlich dazu werden antibakterielle und antivirale Wirkungen beschrieben.

2.2. Erforschung der anti-inflammatorischen Aktivität in Bioassay-Systemen

Für die Aufklärung des anti-inflammatorischen Potentials dieser Pflanze wurde ein pharmakologisches Screening initiiert, bei dem mit Hilfe von Bioassay-Systemen (Zell- bzw. Enzymassays) bestimmte Ziele, die in das inflammatorische Geschehen involviert sind, überprüft werden. Beispiele für Enzymassays sind die Hemmung der Enzyme der Arachidonsäurekaskade (Cyclooxygenasen, Lipoxxygenasen), die Substrate (Arachidonsäure) in Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene) umwandeln. Auch die Inhibition von Enzymen, die für die Substratfreisetzung verantwortlich sind (Phospholipasen) kann so untersucht werden. Daneben ist in Entzündungsassays u.a. die Immunstimulation und die Immunsuppression oder die Freisetzung von Histamin und Serotonin feststellbar.

Für die schnelle Identifizierung aktiver Extraktkomponenten wird die pharmakologische Testung mit der Mikrofraktionierung des Extraktes kombiniert. Dazu wird der Extrakt über eine analytische HPLC aufgetrennt und direkt in die in Bioassay-Systemen genutzten Mikrotiterplatten fraktioniert (Hamburger et al. 2002).

Auf diese Weise konnte bereits Tryptanthrin als dualer COX-2 / 5-LOX Hemmer identifiziert werden (Danz 2002b).

Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass Tryptanthrin auch die induzierbare NO-Synthase (Ishihara et al. 2000) inhibiert und die Bildung der Mediatoren Interferon- γ und Interleukin-2 unterdrückt (Takei et al. 2003).

Denkbar ist, dass der Waid-Extrakt neben Tryptanthrin noch weitere Komponenten (u.a. indolischer Herkunft) enthält, die auf den verschiedenen Ebenen des komplexen Entzündungsgeschehens anti-inflammatorisch wirksam sind. So wurde im chinesischen Waid (*Isatis indigotica*) das Alkaloid Isaindigoton (**10**) als Hemmer der Leukozytenfunktion erkannt (Molina et al. 2001). Basierend auf der aktivitätsbezogenen Mikrofraktionierung in Kombination zum Bioassay konnte in dieser Arbeit die α -Linolensäure als weiterer Inhibitor der 5-Lipoxxygenase identifiziert werden (s. Kap. 4.).

2.3. Pharmakologische Untersuchung *in vivo*

Der Nachweis der anti-inflammatorischen Aktivität von Waidextrakt *in vivo* wurde mit akuten Entzündungsmodellen am Tier (TPA-induziertes Mausohr-Ödem, Carrageenan-induziertes

Rattenpfotenödem) durch Recio et al. (2002) erbracht. In diesen Versuchen konnte die Intensität der Ohr-Ödembildung nach topischer Auftragung von 0,5 mg Extrakt (SFE-Extrakt oder CH₂Cl₂-Extrakt) signifikant um 32 % (SFE) bzw. 62 % (CH₂Cl₂-Extrakt) gehemmt werden. Nach oraler Gabe (100 mg/kg SFE-Extrakt bzw. 125 mg/kg CH₂Cl₂-Extrakt) wurde eine signifikante Hemmung der Ohr-Ödembildung (37 % und 33 %) festgestellt.

Weder Indometacin noch reines Tryptanthrin zeigten auf diesem Weg einen signifikanten Effekt.

Beim Rattenpfotenödem wurde für den Waidextrakt eine dosisabhängige Hemmung der Ödembildung im Zeitraum von 1 bis 3 h nachgewiesen. Für reines Tryptanthrin (Dosen ab 70 mg/kg) konnte keine eindeutige Abhängigkeit zwischen Dosis und Wirkung gefunden werden. Indometacin zeigte 3 h nach Induktion eine starke Hemmung der Ödembildung. Interessant ist, dass nur der Waidextrakt in der Lage war, die Ödembildung bereits in der ersten Stunde nach Induktion zu hemmen. Dies deutet auf die Beeinflussung der Serotonin – und Histaminfreisetzung durch andere, noch nicht identifizierte Extraktstoffe hin (Recio et al. 2002).

In einer weiteren Studie, die an Probanden der Hautklinik Jena durchgeführt wurde, konnten Heinemann et al. (2004) feststellen, dass das Ausmaß der Entzündungsreaktion der Haut nach Induktion einer Kontaktdermatitis durch die Behandlung mit Tryptanthrin allein nicht signifikant gesenkt werden konnte. Dagegen war der Extrakt trotz geringerer Tryptanthrinmengen signifikant wirksam. Auch hier war das rechtzeitige Auftragen der anti-inflammatorischen Testsubstanzen (Tryptanthrin oder Extrakt) während der Hautirritations-Phase für den Effekt, d.h. die Reduktion des Ausmaßes der Entzündungsreaktion, von großer Bedeutung (s. Kap. 5).

Tryptanthrin ist so als dualer COX-2 / 5-LOX-Hemmer ein anti-inflammatorisch wirksames Prinzip, aber die Gesamtaktivität des Waidextraktes wird durch weitere Extraktverbindungen, die an anderen Punkten des komplexen Entzündungsgeschehens eingreifen, hervorgerufen.

In den nun folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Hautpenetrationsstudie von Tryptanthrin (Kap. 3.) und die Identifizierung einer weiteren 5-Lipoxygenase inhibierenden Verbindung (Kap. 4.) vorgestellt und bewertet (Kap. 5.). Die Analytik der indolischen Sekundärmetabolite sowie die Identifizierung und Isolierung eines neuen Indigo-Precursors wird in Kap. 6. behandelt. Die abschließende Diskussion dieser Arbeit wird in Kapitel 7 geführt und die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden sind ab Kap. 8. beschrieben.

Ergebnisse und Diskussion

3. Untersuchung der Hautpenetration von Tryptanthrin mit Mikrodialyse

3.1. Aufbau der Haut und Diffusionswege

Die Haut ist ein Organ, das den Körper mit einer Fläche von ca. $1,6 \text{ m}^2$ bedeckt. Um diese Funktion zu erfüllen, ist die Haut (Cutis) sehr komplex aufgebaut (s. Abb. 3.1.1.). Bereits die die Haut nach außen abgrenzende Oberhaut (Epidermis) mit einer Dicke von 0,1 mm, ist aus mehreren Gewebsschichten (u.a. Stratum corneum, Str. lucidum, Str. basale) aufgebaut. Die sich nach innen anschließende Lederhaut (Dermis, Korium) mit einer Dicke von ca. 0,6-3 mm besteht aus zwei verschiedenen Gewebsschichten, dem Stratum papillare und dem Stratum reticulare und den darin eingebetteten Anhangsgebilden (Haare, Schweiß –und Talgdrüsen). Nach unten wird die Haut durch die Unterhaut (Subkutis) abgeschlossen.

Zur Blutversorgung der oberen Haut befindet sich ein oberflächliches Gefäßnetz im Stratum papillare der Lederhaut (Dermis), während tiefere Gewebsschichten durch weiteres Gefäßnetz, das an der Grenze zwischen Unterhaut (Subcutis) und Lederhaut unter den Papillarkörpern liegt, versorgt werden. Die Innervation erfolgt durch den subpapillären Plexus (markhaltige sensible und marklose autonome Äste peripherer Nerven), der oft in Form freier Nervenendigungen sowie an bestimmten Körperchen bzw. Gefäß – und Haarmuskeln oder Drüsen endet (Roche-Lexikon).

Die wichtigste Aufgabe der Haut ist die Barrierefunktion zur Außenwelt. Das Stratum corneum, das aus proteinreichen Korneozyten (Keratin-Matrix), eingebettet in einer Interzellularmatrix aus unpolaren Lipiden und lamellaren Lipidschichten besteht (Blank 1965, Scheuplein 1965), stellt die wichtigste Diffusionsbarriere für die Penetration hydrophiler Stoffe dar (Elias et al. 1977, Elias 1983, Elias und Menon 1991). Die Lipidschichten bestehen aus Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren und werden aus polaren Lipidvorstufen (Phospholipide, Glycosphingolipide) durch Exocytose aus den Zellen des Stratum granulosum ausgeschleust. Damit stellen die Lipidschichten der Haut einen wichtigen Bestandteil der Hautbarriere dar. Durch diesen Aufbau gibt es für applizierte Substanzen nur wenige Möglichkeiten, um in die Haut zu diffundieren. In Abhängigkeit der Hydrophilie-Lipophilie-Achse eines Moleküls, der Molekülgröße und Polarität gelangen Substanzen entweder auf dem interzellulären Weg entlang der lamellaren Lipide (zwischen den Korneozyten), dem intrazellulären Weg (durch die Korneozyten) oder über die Hautanhangsgebilde (Haarfollikel,

Talg- bzw. Schweißdrüsen) in tiefere Hautschichten. Dabei diffundieren hydrophile Moleküle bevorzugt über interzelluläre Wege entlang der wasserhaltigen Domänen der Lipidbilayer oder transzellulär durch die Korneozyten. Lipophile Moleküle können interzellulär direkt entlang der Lipidlayer diffundieren. Die besten Penetrationseigenschaften besitzen jedoch amphiphile bzw. kleine unpolare lipophile Moleküle (Schnetz und Fartasch 2000, Morgan et al. 2002, Moghimi et al. 1999).

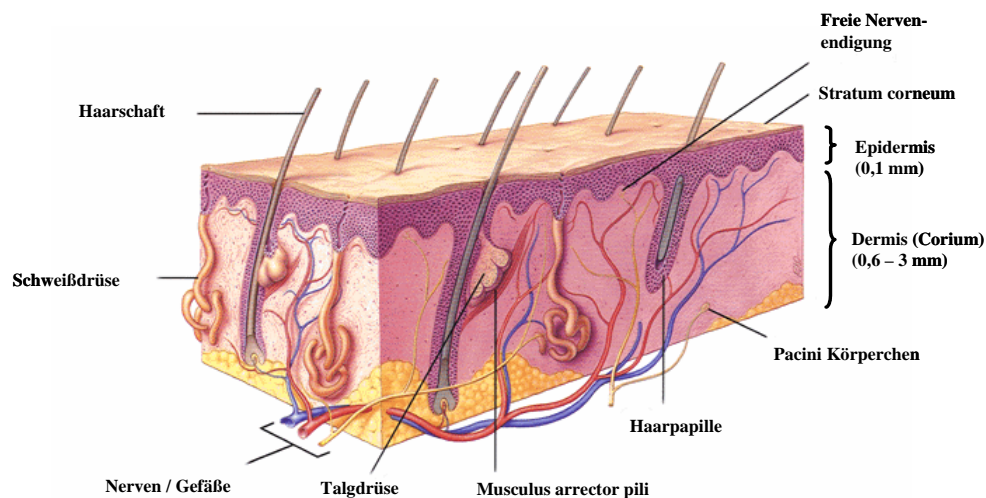


Abb. 3.1.1.: Aufbau der Haut (Quelle: [www. healthandage. com](http://www.healthandage.com) [Juli 2002])

3.2. Voraussetzungen für die Diffusion durch die Haut

Das Ausmaß der Penetration einer Substanz in die Haut ist, wie oben beschrieben, einerseits vom strukturellen Aufbau der Haut abhängig, andererseits bestimmen die physikochemischen Eigenschaften des diffundierenden Stoffes seine Penetrationsfähigkeit. So beeinflussen Lipophilie, stereochemische Eigenschaften, Ladung und Molekülgröße die Diffusionsfähigkeit einer Substanz in die Haut. Mit steigendem Molekulargewicht verringert sich die Penetrationsfähigkeit (Guy und Hadgraft 1989). Als Maß für die Lipophilie wird der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ($\log P$) genutzt. Substanzen mit einem $\log P$ von +2 zeigen demnach die besten Penetrationsvoraussetzungen (Morgan et al. 2003).

Die Fähigkeit einer Substanz durch die Hautbarriere zu gelangen, wird auch durch die Zerstörung der Lipidschichten des Stratum corneums verbessert. Dies wurde u.a. durch Abtragung der Lipide mittels Tape stripping oder Vorbehandlung der Haut mit 1 %

Natriumlaurylsulfat (SLS) bzw. Aceton erreicht (Bronaugh und Stewart 1985b, Benfeldt et al. 1999a, Benfeldt und Serup 1999, Morgan et al. 2003)

3.3. Methoden zur Untersuchung der Hautpenetration einer Substanz

Seit den 70er Jahren verwendete man für die Untersuchung der perkutanen Absorption *in vitro* Diffusionszellen in verschiedenen Ausführungen. Die ersten Diffusionszellen wurden unter statischen Bedingungen (Franz 1975, Franz 1978, Bronaugh und Stewart 1984) betrieben, später gab es Weiterentwicklungen zu Durchflusszellen (Bronaugh und Stewart 1985a, Reifenrath et al. 1994). Dabei wurde isolierte menschliche oder tierische Haut (Ratte, Maus, Schwein, Meerschwein) eingesetzt (Bronaugh und Stewart 1986, Bronaugh et al. 1986). Als Rezeptorflüssigkeiten wurden verschiedene Lösungen (u.a. physiologische Puffer, Ethanol-Wasser-Gemische, isoton. Kochsalzlösung), z.T. mit Zusätzen (z.B. Rinderserumalbumin, Polyethylenglykol) zur Erhöhung der Löslichkeit lipophiler Substanzen, verwendet (Bronaugh et al. 1999).

Weitere Methoden, die zur Erforschung der pharmakokinetischen resp. pharmakodynamischen Eigenschaften von Wirkstoffen *in vivo* eingesetzt wurden, sind die Hautblasentechnik (Averbeck et al. 1989, Benfeldt et al. 1999b) und die Entnahme von Haut (Biopsie). Heute noch wird die Technik des Tape-Strippings zur Quantifizierung von Stoffen in Stratum corneum (Surber et al. 1999, Bronaugh und Maibach 2002) oder für die Permeabilitätssteigerung von Stoffen durch das gestörte Stratum corneum (Benfeldt et al. 1999a, Benfeldt und Serup 1999) verwendet. Diese Techniken jedoch führen zu einer Verletzung der Hautbarriere und geben nur punktuelle Messergebnisse.

Seit ca. 1990 gewinnt die kutane Mikrodialyse an Bedeutung und verdrängt zunehmend die bisher verwendeten Techniken.

3.4. Hautmikrodialyse

Ursprünglich war die Mikrodialyse zur Messung von Neurotransmittern bzw. Aminosäuren im interstitiellen Raum (Gehirn) entwickelt worden (Bito et al. 1966, Delgado et al. 1972).

Aber schon bald wurden auch weitere Gewebe bzw. Organe (Muskeln, Auge, Herz, subkutanes Fettgewebe) mittels Mikrodialyse erforscht. Durch Ungerstedt (1984) wurde der Einsatz sehr dünner Dialyseschläuche, die von einer Flüssigkeit perfundiert werden, möglich und 1991 wurde durch Andersson et al. erstmals eine Untersuchung der Hautpenetration von Ethanol durch kutane Mikrodialyse durchgeführt.

Es folgten eine Reihe von Studien, bei denen endogene Substanzen wie Histamin in gesunder (Anderson et al. 1992) oder erkrankter Haut (Anderson et al. 1995) und die Absorption exogener Substanzen (Arzneistoffe oder Schadstoffe) untersucht wurden (Gottlob et al. 2002). Bei der Mikrodialyse wird eine perfundierbare, röhrenförmige, semipermeable Membran (i.d. 200 µm) in die Lederhaut parallel zur Hautoberfläche in einer Tiefe von 0,5-1 mm implantiert (s. Abb. 3.4.1.). Sie hat dort die Funktion eines „künstlichen Blutgefäßes“. Je nach Materialart ist es möglich, Moleküle bis zu einem bestimmten Molekulargewicht (Ausschlussgrenze) zu dialysieren. Proteine und Enzyme können dagegen nicht in die Dialysemembran übergehen.

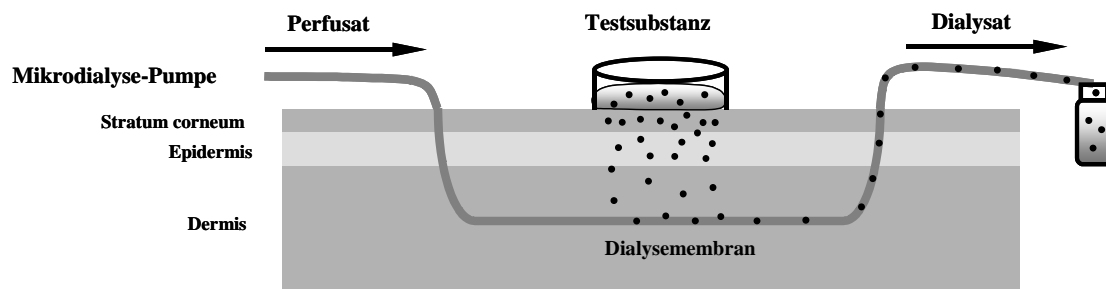


Abb. 3.4.1. Prinzip der kutanen Mikrodialyse

Um die instabile Membran in der Haut zu platzieren, ist das Einführen einer „Begleitkanüle“ nötig. Trotz der minimalen Invasivität der Hautmikrodialyse ist eine Reaktion der lebenden Haut auf die Einbringung der Kanüle / Membran beobachtet und in zahlreichen Studien bewiesen worden. So verursacht die Nadel ein Trauma mit Anstieg des Blutflusses, einer Histaminfreisetzung und Hautrötung sowie Anstieg der Hautdicke (Ödem). Diese Hautreaktionen sind jedoch nur vorübergehend und ihr Ausmaß kann durch verschiedene Methoden gemessen werden (u.a. Laser Doppler Bildgebung, Chromametrie, Ultraschall). Daher werden bei Hautmikrodialyseversuchen *in vivo* Äquilibrierungszeiten von ca. 30-60 min nach Membranverlegung und der Einsatz von lokalen Anästhetika vorgeschlagen (Groth und Serup 1998, Groth et al. 1998).

Außerdem wird die Intaktheit der Hautbarriere *in vivo* durch die Messung des TEWL (transepidermaler Wasserverlust) festgestellt (Rougier et al. 1999), während die Membrantiefe durch Ultraschall bestimmt wird. Beide Werte werden bei *in vivo* Mikrodialyseversuchen routinemäßig erfasst, um erhaltene Ergebnisse, d.h. die Permeationseigenschaften einer Substanz besser interpretieren zu können.

3.5. Hautmikrodialyse mit tierischer Haut (Schweinehautmodell)

Für die Untersuchung der Penetrationseigenschaften von Tryptanthrin mit Mikrodialyse wurde ein *ex vivo* Modell entwickelt, bei dem die Schweinehaut am Spitzbein verwendet wurde. Die Haut des Schweins ist der menschlichen Haut in Aufbau (z.B. Anzahl der Haarfollikel je cm²) sehr ähnlich. Für Penetrationsstudien wird neben Schweinehaut auch haarfreie Haut von Ratten oder Mäusen als Modell verwendet, obwohl die Durchlässigkeit der tierischen Haut oft größer ist als die humaner Haut (Bronaugh et al. 1982).

3.5.1. Ermittlung der *in vitro* Recovery von Tryptanthrin an Cuprophane[®]

Um eine spätere Abschätzung der Gewebespiegel der dialysierten Substanz (Tryptanthrin) aus den gemessenen Konzentrationen in den Dialysaten zu ermöglichen, ist die Bestimmung der Wiederfindungsrate notwendig (Kovar et al. 1997). Bei der *in vitro* Recovery, die hier bestimmt wurde, wird das Maß der Reproduzierbarkeit bei der Wiederverwendung dergleichen Mikrodialysemembran (Material Cuprophane[®], i.d. 200 µm, Wandstärke 8 µm) für die zu untersuchende Substanz (Tryptanthrin) bei der Verwendung einer bestimmten Perfusionslösung (isotonische Kochsalzlösung) und einer definierten Flussrate (2 µl/min) bei Raumtemperatur gemessen (s. Kap. 12.9.). Sie wird aus der Konzentration der Substanz im Dialysat (dial) im Verhältnis zur bekannten Konzentration der Substanz in der Kammerlösung (Medium, med) berechnet:

$$\text{Recovery}_{in vitro} = c_{dial} / c_{med} \cdot 100 \% . \quad (\text{Gleichung 1})$$

Für Tryptanthrin konnte eine *in vitro* Recovery von 90-96 % (s. Abb. 3.5.1.1.) unter den oben angegebenen Bedingungen bestimmt werden. Versuche mit einer Flussrate von 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ gaben schon eine geringere relative Recovery von 60-80 %.

Zur Abschätzung der Gewebespiegel von Tryptanthrin anhand der gemessenen *in vitro* Recovery siehe Kap. 3.8.

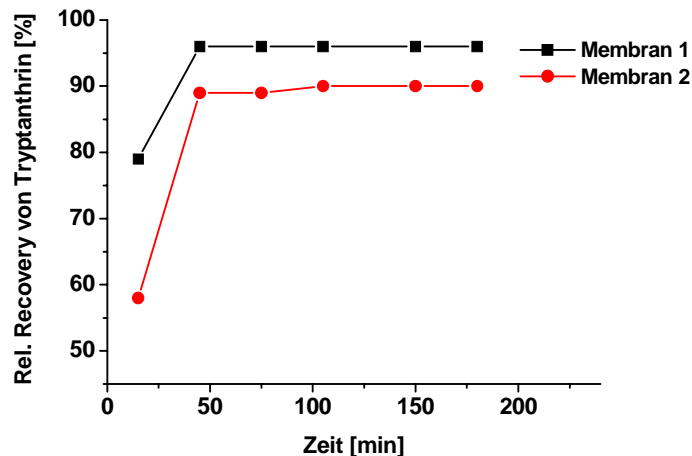


Abb. 3.5.1.1.: Recovery von Tryptanthrin

3.5.2. Aufbau des Mikrodialyse – Experimentes am Schweinehautmodell

Für die Experimente wurde stets frisches Material (Spitzbein vom Hausschwein) eingesetzt. Nach Verlegung der beiden Mikrodialysmembranen und Anschluss an die Pumpe (s. Kap. 12.) wurden diese 30 min lang mit einer Flussrate von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ äquilibriert. Um gleich große Applikationsflächen für beide Testfelder (A/B) oberhalb der verlegten Membranen zu gewährleisten, wurden 2 Glasringe (i.d. 12 mm) aufgeklebt. Auf diese Testflächen wurden die gleichen Mengen Tryptanthrin, einmal in Form einer reinen acetonischen Tryptanthrinlösung (Testfeld A) und einmal in Form eines tryptanthrin-angereicherten *Isatis*-Extraktes (Testfeld B) gegeben und der Mikrodialyseversuch gestartet (s. Abb. 3.5.2.1.). Als Perfusionslösung diente isotonische Kochsalzlösung mit einer Perfusionsrate von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Gesamtdauer des Experimentes betrug 5 h, es wurden 10 Fraktionen (zu 30 min) gewonnen.

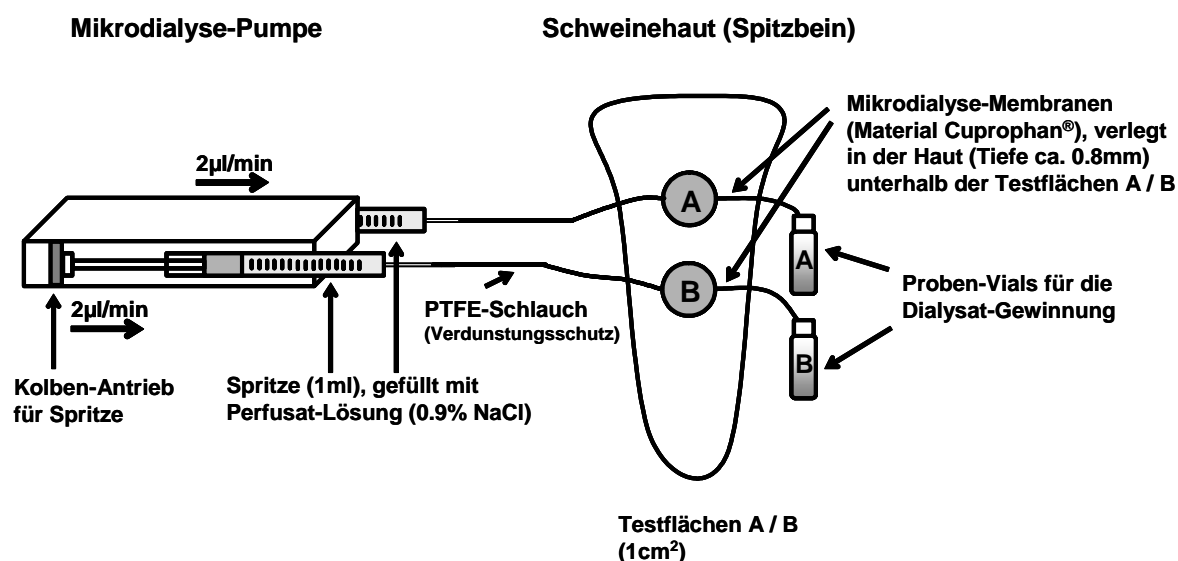


Abb. 3.5.2.1.: Aufbau des Mikrodialyse-Experimentes

Durch die Ausschlussgrenze der verwendeten Dialysemembran (5000 Dalton) war eine weitere Aufbereitung der Dialysatproben nicht notwendig. Für die Analyse mittels HPLC-ESI-MS wurde nur noch eine definierte Menge des internen Standards (d_8 -Tryptanthrin) zugesetzt (s. Kap. 12.6.) und die Probe direkt vermessen (HPLC-System 2a, s. Kap. 14.3. und MS-Bedingungen s. Kap. 15.2.).

3.6. Entwicklung der HPLC – MS – Analytik

3.6.1. Voraussetzungen und Problematik

Bereits in der Literatur wird die enorme Bedeutung einer geeigneten Analytik zur Erfassung des gesuchten Stoffes in den Dialysaten angesprochen (Gottlob et al. 2002, Schnetz und Fartasch 2000). Die Messung der oft sehr geringen Substanz-Konzentrationen in den Dialysaten stellt ein großes Problem oder gar die Grenze der Mikrodialyse dar, wenn keine ausreichend sensitive analytische Methode zur Verfügung steht oder entwickelt werden kann. In Anbetracht dieses Problems wurde für die Mikrodialyse von Tryptanthrin eine Methode geschaffen, bei der eine Vortrennung der Dialysatprobe auf einer HPLC-Säule stattfindet, die Detektion bzw. Quantifizierung des Tryptanthrins aber massenspektroskopisch im Single Ion

Mode (SIM-Modus) erfolgt. Basierend auf der HPLC-MS-Methode von Danz et al. (2002a) zur Bestimmung von Tryptanthrin in Extrakten, wurde das System durch den Einsatz einer kurzen Säule (LiChroCART® RP-18-Purospher STAR 55 x 2 mm i.d., endcapped) sowie durch die Nutzung eines internen Standards (d_8 -Tryptanthrin, s. Kap. 3.6.2.) so weiter entwickelt, dass die Nachweisgrenze von 1 ng auf 100 pg (Tryptanthrin on-column) gesenkt werden konnte. Die eingesetzte Kurz-Säule dient der effektiveren Aufkonzentrierung der geringen Tryptanthrinmengen. Außerdem wurde dem Massenspektrometer ein Ventil (s. Abb. 3.6.1.1.) vorgeschaltet, mit dem nur das Zeitfenster des Tryptanthrinpeaks in die Ionenquelle des Massenspektrometers geleitet wurde. Damit konnte die Verunreinigung der Ionenquelle (hohe Salzbelastung durch NaCl in den Dialysaten) durch die hohe Probenzahl vermindert werden. Da beide Substanzen, Tryptanthrin (Analyt) und d_8 -Tryptanthrin (interner Standard) die gleichen chromatographischen Eigenschaften besitzen und somit zeitgleich aus dem HPLC-System eluieren und in die Ionenquelle übertreten, sind für beide die Ionisierungsbedingungen im Turbospray-Verfahren identisch. Durch alleinige Erfassung der beiden Spuren (Analyt m/z 249 amu und interner Standard m/z 256 amu) im SIM-Modus wird die Sensitivität ebenfalls erhöht. Mit diesen Bedingungen (HPLC-System 2a, s. Kap. 14.3. und Parameter Massenspektroskopie, s. Kap. 15.2.) konnte eine sehr empfindliche Methode für das Screening der Mikrodialyse – Proben entwickelt werden. Eine schematische Übersicht über den Ablauf der Analyse der Dialysatproben gibt die folgende Abbildung:

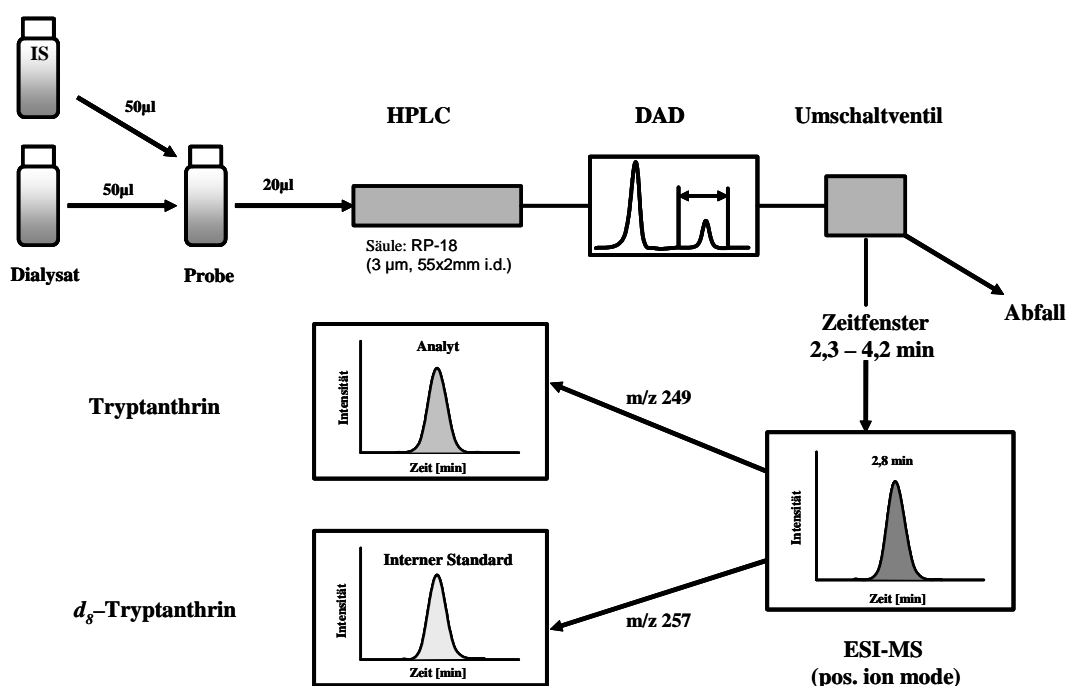


Abb. 3.6.1.1.: Schema zur HPLC-MS-Analytik der Dialysate

3.6.2. Herstellung des internen Standards d_8 -Tryptanthrin durch Synthese

Der Einsatz von internen Standards bei der Quantifizierung von Analyten hat im Gegensatz zur Quantifizierung mit externem Standard einige Vorteile, von denen die Fehlerminimierung bei der Probenvorbereitung und Analyse sowie die Erhöhung der Robustheit der Methode zu nennen sind. Bei der Analyse von Substanzen mit Quantifizierung über Massendetektion muss der interne Standard die gleichen chromatographischen Eigenschaften aufweisen, so dass er zeitgleich mit dem Analyten von der HPLC-Säule eluiert, unter denselben Ionisationsbedingungen im Turbospray ionisiert, aber durch seine höhere Masse vom Analyten zu unterscheiden ist. Dazu werden in der Analytik Isotopen-markierte Substanzen, z.B. deuterierte Substanzen („deuterierter Analyt“) verwendet (Choi et al. 1999). Für die Analytik zur Tryptanthrin-Quantifizierung wurde daher deuteriertes Tryptanthrin (d_8 -Tryptanthrin) verwendet. Nachdem Deuterierungsversuche von Tryptanthrin mit deuterierter Phosphorsäure / Bortrifluorid oder deuterierter Essigsäure unter Einwirkung hoher Temperaturen über mehrere Tage zu keinem Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium im Tryptanthrinmolekül führten (Rasku et al. 1999, Rasku und Wähälä 2000), musste das deuterierte Tryptanthrin synthetisch dargestellt werden. Dazu wurde d_5 -Anilin nach der Sandmeyer – Reaktion (Sandmeyer 1919) über d_5 -Isonitrosoacetanilid zum d_4 -Isatin umgesetzt, das anschließend nach der Reaktion von Friedländer und Roschdestwensky (1915) zu deuteriertem Tryptanthrin umgesetzt wurde (s. Kap. 11.2.). Durch Bestimmung der Masse und Aufnahme von NMR – Spektren (siehe Anhang) der Synthesezwischenprodukte (d_5 -Isonitrosoacetanilid, d_4 -Isatin) und des Endproduktes d_8 -Tryptanthrin wurde festgestellt, dass während der Synthese ein Rücktausch von Deuterium gegen Wasserstoff an bestimmten Stellen im Isatinmolekül und damit im Tryptanthrinmolekül stattfindet. Zur Minimierung des Rücktausches wurden daher alle Syntheseschritte in deuterierten Lösungsmitteln durchgeführt. Dies führte schließlich zu einem Endprodukt, bestehend aus d_8 / d_7 / d_6 – Tryptanthrin (77,5 %, 20,7 % und 1,8 %). Eine Übersicht über die Charakterisierung der Synthesezwischenstufen und des Endproduktes d_8 -Tryptanthrin sowie über die bevorzugten Rücktauschpositionen ist im Anhang zu finden.

3.6.3. Validierung der HPLC-MS-Methode

Spezifität / Selektivität

Bei der Spezifität einer Analysenmethode muss gezeigt werden, dass der zu untersuchende Analyt ohne Beeinflussung der in der Probe vorhandenen, weiteren Komponenten bzw. der Matrix erfasst werden kann. Durch die Kombination von HPLC und ESI-MS ist dies zweifach gegeben. Einerseits besitzt der Analyt Tryptanthrin auf der eingesetzten Säule unter den gegebenen Bedingungen (HPLC-System 2a, s. Kap. 14.3.) eine charakteristische Retentionszeit von 2,7-3,1 min. Durch den DAD – Detektor kann das UV/VIS-Spektrum (190-700 nm) von Tryptanthrin mit seinen typischen Absorptionsmaxima (251, 278, 312, 328, 387 nm, siehe Anhang) stets online überprüft werden. Andererseits wird Tryptanthrin im Massenspektrometer im Single Ion Mode ($[M+H]^+$ mit $m/z = 249$ amu) erfasst (s. Kap. 15.2.). Der zugesetzte interne Standard (d_8 -Tryptanthrin) verhält sich chromatographisch identisch, kann dann aber selektiv durch seine höhere Masse ($[M+H]^+$ mit $m/z = 257$ amu) im Massenspektrometer vom Analyten unterschieden werden.

Wiederholbarkeit (Präzision, Wiederholpräzision)

Die Präzision ist das Maß der Übereinstimmung von Einzelergebnissen bei wiederholter Durchführung der Analyse einer Probe. Diese zufällige Streuung der Messergebnisse wird in Form der Standardabweichung (SD) oder relativen Standardabweichung (RSD) angegeben. Die Überprüfung der Präzision wurde durch die mehrfache Aufnahme der Kalibrierkurven zu unterschiedlichen Zeitpunkten [vor Beginn (0 h), am Ende (530 h) der Messungen sowie innerhalb der Probensequenz (218, 358 h)] mit den Kalibrierlösungen ermittelt. Alle Kalibrierkurven ergaben die gleiche lineare Korrelation mit der Funktion $f(x) = 0,105 \cdot x$ ($R^2 = 0,9996$, s. Abb. 3.6.3.1.). Die relativen Standardabweichungen für die einzelnen Messpunkte (Konzentrationen) der vier Kalibrierkurven betrugen 1,0-2,4 %.

Die Wiederholpräzision gibt die Präzision des Analysenverfahrens unter Wiederholbedingungen an. Vergleicht man die Kalibrierkurven aus der Mikro dialyse-Sequenz [$f(x) = 0,105 \cdot x$] mit den Kalibrierkurven der Tryptanthrin-Quantifizierung in Extrakten [$f(x) = 0,0909 \cdot x$], die in gleicher Weise 16 Monate später aufgenommen wurden (s. Kap. 6.2.), so

ist bei beiden der gleiche funktionale, lineare Zusammenhang zwischen Analytmenge x (Tryptanthrin on-column) und Peakflächenverhältnis $f(x)$ (Analyt / Interner Standard) mit $f(x) = 0,1 \cdot x$ festzustellen.

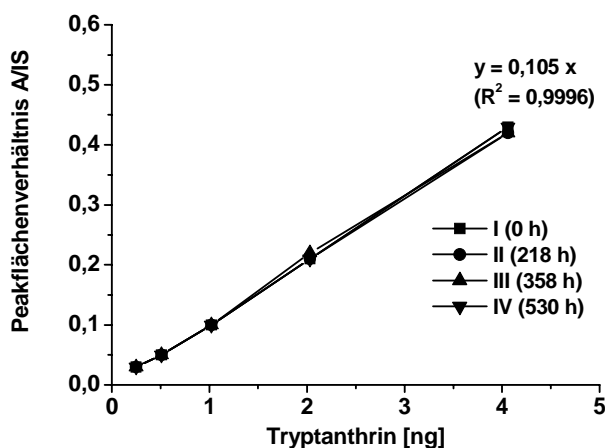


Abb. 3.6.3.1.: Kalibrierkurven I bis IV

Arbeitsbereich, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Robustheit der Methode

Arbeitsbereich: Zwischen Messsignal und Analytkonzentration sollte möglichst ein linearer Zusammenhang bestehen. Das Maß der linearen Korrelation zwischen Analytkonzentration (Tryptanthrin in ng on-column) und Peakflächenverhältnis (Analyt / Interner Standard) wird durch den Regressionsfaktor (R^2) angegeben. Bei allen aufgenommenen Kalibrierkurven des Arbeitsbereiches (0,25 – 4 ng Tryptanthrin on-column) konnte eine sehr gute Regression mit $R^2 > 0,999$ festgestellt werden.

Nachweisgrenze/Bestimmungsgrenze: Diese konnten mit 100 pg (Signal/Rauschen 3:1) bzw. 500 pg (Signal/Rauschen 10:1) Tryptanthrin on-column ermittelt werden.

Robustheit: Sie spiegelt die Resistenz des Analysenverfahrens gegen Störungen im Rahmen der Arbeitsbedingungen wieder. Es konnte gezeigt werden (siehe Wiederholbarkeit), dass selbst nach Wochen resp. Monaten die gleichen funktionalen Zusammenhänge mit den Kalibrierlösungen ermittelt werden konnten. Ein Wechsel der Säule (gleiche Charge und Hersteller) oder des Laufmittels (Roth, Karlsruhe oder Merck, Darmstadt) bzw. die Durchführung der Analyse durch andere Analytiker hatte keinen Einfluss auf das Messergebnis. Die Stabilität der Kalibrierlösungen ist bei Aufbewahrung im Kühlschrank (dicht verschlossen) über ca. 8 Wochen gegeben.

3.7. Hautpenetration von Tryptanthrin

Die Grundlage für diese Untersuchungen bildete die Entdeckung von Tryptanthrin als ein anti-inflammatorisches Prinzip in Extrakten des Färberwauds (s. Kap. 1. und 2.2.). Tryptanthrin zeigt u.a. inhibitorische Aktivität gegen Enzyme der Arachidonsäure-Kaskade COX-2 und 5-LOX (Danz et al. 2001, 2002a, 2002b) sowie gegen die induzierbare NO-Synthase (Ishihara et al. 2000). Auf beiden Wegen werden Entzündungsmediatoren wie Prostaglandin, Leukotrien und NO als Entzündungs-Antwort auf die Einwirkung von Noxen freigesetzt.

Die Erkenntnisse weiterführender *in vivo* Studien (s. Kap. 2.2.), bei denen die anti-inflammatorische Aktivität des *Isatis*-Extraktes nach oraler oder lokaler Gabe höher war als die von Tryptanthrin, führten zu der Frage, ob und in welchem Ausmaß Tryptanthrin in der Lage ist, in die Haut zu penetrieren.

Da in den *in vivo* Studien die Applikation des Extraktes im Vergleich zum reinen Alkaloid von Vorteil war, sollte mit dieser Studie nicht nur einfach die Penetration von Tryptanthrin untersucht werden, sondern es galt, auch den möglichen Einfluss des Vehikels (Extrakt) auf das Ausmaß der Penetration zu überprüfen. Dazu wurde Tryptanthrin aus reiner Lösung im Vergleich zu Tryptanthrin aus Extraktlösung appliziert. Als „Wirkung“ nach Auftragung unterschiedlicher Tryptanthrinmengen („Dosis“) wurde in diesen Versuchen die durchschnittliche Dialysatkonzentration von Tryptanthrin (ng/ μ l) ermittelt.

In den Versuchen wurde Tryptanthrin auf die Testfelder (s. Kap. 3.5.2.) entweder in Form einer reinen, acetonischen Lösung oder in Form einer tryptanthrin-angereicherten acetonischen Extraktlösung aufgetragen. Dabei waren die Tryptanthrin-Konzentrationen auf beiden Testfeldern stets gleich. Die kleinste Konzentration (0,115 mg/ml) entsprach dabei der nativen Tryptanthrinmenge in 0,5 g SFE-Extrakt (Charge 01/2002, Gehalt 0,23 %), gelöst in 10 ml Aceton. Es wurden jeweils 50 μ l der fünf verschiedenen Konzentrationen (0,115 / 0,23 / 0,46 / 0,92 / 1,84 mg/ml, s. Kap. 12.2.) entsprechend 5,75 / 11,5 / 23 / 46 / 92 μ g Tryptanthrin auf der Haut getestet, je Konzentration und Testlösung wurden 3 Individuen (n = 3) getestet und die Werte (Dialysatkonzentrationen) gemittelt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in den folgenden Abbildungen (3.7.1.a und 3.7.1.b) dargestellt:

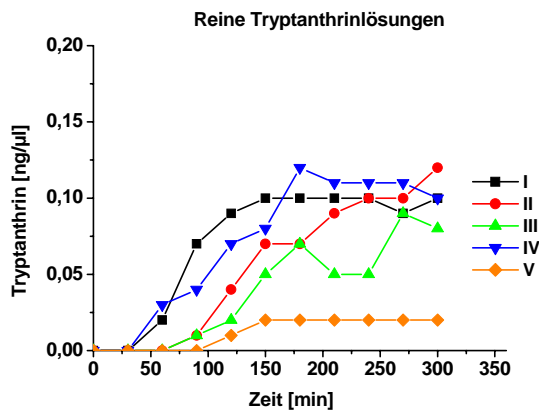


Abb. 3.7.1.a: Dialysatkonzentrationen nach Auftrag reiner Tryptanthrinlösungen I-V

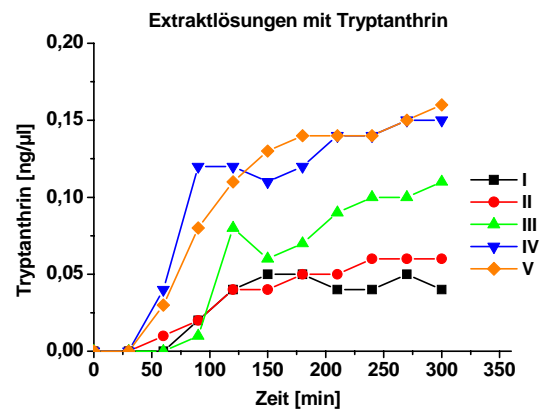


Abb. 3.7.1.b: Dialysatkonzentrationen nach Auftrag von Extraktlösungen I-V

Bereits 30 min nach Auftragung der Testlösungen ist Tryptanthrin in den Dialysaten nachweisbar. Vergleicht man die Kurven der Dialysatkonzentrationen nach Auftragung der reinen Tryptanthrinlösung und der gespickten Extraktlösung, so kann man erkennen, dass nach Auftragung der reinen Tryptanthrinlösungen trotz ansteigender Tryptanthrinmengen auf der Haut (5,75-92 µg), die Konzentrationen von Tryptanthrin im Dialysat nicht ansteigen, sondern dass nach ca. 150 min bei den Kurven I-IV ein Plateau mit ca. 0,05-0,10 ng/µl erreicht wird. Die höchste Tryptanthrinmenge (92 µg), die auf die Haut aus reiner Lösung appliziert wurde (V), führt hier sogar zu den niedrigsten Dialysatkonzentrationen (<0,025 ng/µl).

Betrachtet man dagegen die Dialysatkonzentrationen, die sich nach Auftragung der gespickten Extraktlösungen messen lassen, so ist ein eindeutiger, dosisabhängiger Anstieg des Tryptanthringehaltes festzustellen, der jedoch bei den höchsten Testlösungen IV und V im Bereich von 0,10-0,15 ng/µl stagniert. So würden vermutlich Extraktlösungen mit noch höherem Tryptanthringehalt keinen weiteren Effekt erzielen.

Auch hier kann man sehen, dass es bei allen Kurven eine Anfangsphase (0-150 min) und eine Plateauphase (ab ca. 150 min) gibt. Trägt man die Mittelwerte der Dialysatkonzentrationen gegen die auf die Haut applizierte Tryptanthrinmenge (µg) auf, so erhält man die in der Grafik (s. Abb. 3.7.2.) dargestellten Kurven. Bei den Extraktlösungen I-IV besteht zwischen aufgetragener Menge und Dialysatkonzentrationen ein linearer Zusammenhang. Bezieht man Extraktlösung V mit ein, ergibt sich ein funktioneller Zusammenhang 2. Ordnung. Auch bei den reinen Tryptanthrinlösungen I-V ergibt sich eine Funktion 2. Ordnung.

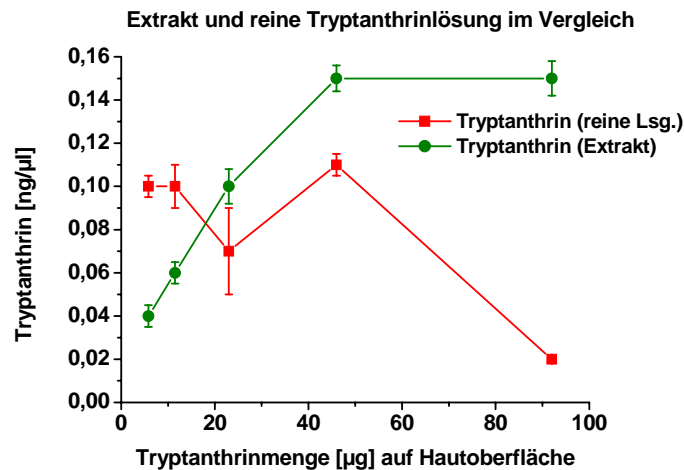


Abb. 3.7.2.: Dialysatkonzentrationen versus Tryptanthrinmenge auf der Haut ($n = 3$)

In der Anfangsphase nach Auftragung der Testlösungen (0-150 min) diffundiert Tryptanthrin durch die einzelnen Schichten der Haut, in Abhängigkeit von Aufbau und Dicke der Schicht könnten dies unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeiten sein. Die Diffusion durch das Stratum corneum, der wichtigsten Hautbarriere, könnte hierbei möglicherweise ein wichtiger, geschwindigkeitsbestimmender Schritt sein. Nach einer bestimmten Zeit (ca. 30 min) erreicht Tryptanthrin dann die Mikrodialysemembran. Durch die Perfusion der Membran mit Kochsalzlösung gibt es ein Konzentrationsgefälle zwischen interstitiellen Raum (Dermis) mit aus oberen Schichten heran diffundierenden Tryptanthrinmolekülen und der Dialysemembran, so dass Tryptanthrin in die Membran übertritt, wo es dann abtransportiert wird. Erst wenn sich alle Hautschichten entsprechend mit Tryptanthrin abgesättigt sind, so dass die Menge an nachdiffundierenden Tryptanthrinmolekülen je Fläche und Zeiteinheit gleich der Menge der in die Membran übertretenden Moleküle ist, wird ein Gleichgewichtszustand erreicht, der sich in Form einer Plateauphase äußert.

Eine weitere Voraussetzung ist dabei, dass Tryptanthrin auf der Hautoberfläche in Lösung ist. So ist die Höhe der Plateauphase von der Löslichkeit von Tryptanthrin in der aufgetragenen Testlösung abhängig. Wenn die Löslichkeit jedoch groß genug ist, d.h. genug im gelösten Zustand befindliche Tryptanthrinmoleküle vorhanden sind, dann ist das Erreichen des Gleichgewichtszustandes nur noch durch die Diffusionsgeschwindigkeiten von Tryptanthrin in den einzelnen Hautschichten abhängig. Diese Diffusionsgeschwindigkeiten werden sowohl durch den Aufbau der einzelnen Hautschichten, u.a. durch ihren hydrophilen oder lipophilen

Charakter und Wassergehalt, als auch durch die physikochemischen Eigenschaften des diffundierenden Moleküls, insbesondere seiner Lipophilie, ausgedrückt als log P-Wert, sowie Molekulargewicht und Ladung bestimmt.

Die Ursache für den Abfall der Tryptanthrinkonzentration in den Dialysaten der reinen Tryptanthrinlösung V liegt also in der geringeren Löslichkeit von Tryptanthrin in Aceton im Vergleich zum Extrakt begründet. Durch die Verdunstung des Lösungsmittels Aceton wird die Lösung immer mehr aufkonzentriert, bis die Sättigungsgrenze erreicht wird und die Bildung von Tryptanthrinkristallen (s. Abb. 3.7.3.a) einsetzt. Je näher die Anfangskonzentration der Tryptanthrinlösung bereits an der Sättigungslöslichkeit von Tryptanthrin in Aceton (2 mg/ml) liegt, dies ist bei Lösung V mit 1,82 mg/ml der Fall, um so schneller wird diese erreicht, überschritten und die Kristallisation setzt ein. In wenigen Sekunden sind sämtliche, bisher gelöste Tryptanthrinmoleküle auf der Hautoberfläche auskristallisiert und damit wird der Diffusionsprozess in die Haut abgebrochen. Die geringe Konzentration an Tryptanthrin, die sich bis zum Ende des Experimentes trotzdem in den Dialysaten findet, dürfte an der „Initialdosis“, d.h. den Molekülen liegen, die anfangs noch in Lösung waren und in die Hautschichten diffundierten. Möglich ist auch, dass sich in den Hautlipiden auf der Oberfläche bereits auskristallisiertes Tryptanthrin noch minimal nachlöst. Die Kontaktzeit gelöster Moleküle zur Haut ist in Lösung V jedoch extrem kurz. Bei den Lösungen I-IV, die weit von der Sättigungskonzentration entfernt sind, sind die Kurvenverläufe trotz unterschiedlicher Tryptanthrin-Konzentrationen ähnlich, d.h. hier ist die Menge an Tryptanthrin, die über das Stratum corneum in die Haut je Zeiteinheit hinein diffundiert vergleichbar und wird nur noch durch die vorgegebene Fläche des Testfeldes limitiert, d.h. eine Erhöhung des Tryptanthrinlevels in den Dialysaten könnte über eine Vergrößerung der Testfläche erreicht werden.

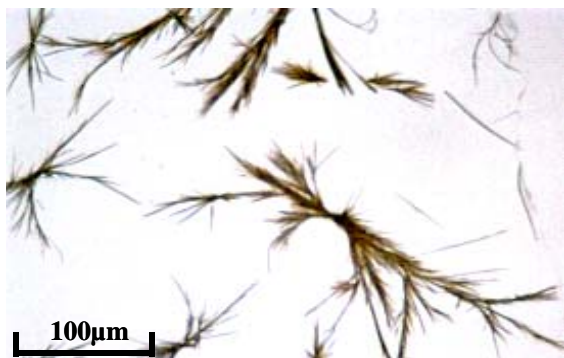


Abb. 3.7.3.a: Tryptanthrinkristalle (1:100)

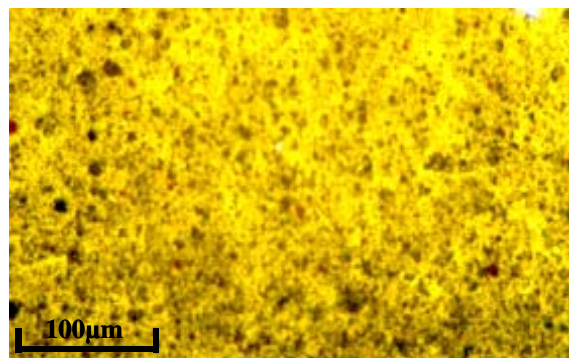


Abb. 3.7.3.b: SFE-Extrakt (1:100)

Dagegen scheint der Extrakt eine Matrix darzustellen, in der das Tryptanthrin amorph verteilt ist. Unter dem Polarisationsmikroskop wurden keine Tryptanthrinkristalle in der Extraktmatrix gefunden (s. Abb. 3.7.3.b). Denkbar ist auch, dass eine Löslichkeitvermittlung des Extraktes durch weitere lipophile Begleitstoffe stattfindet, die auch in die Haut diffundieren können und dem Tryptanthrin als „Transporter“ durch Lösungsvermittlung dienen und damit seine Diffusion bis zu einem gewissen Grad fördern. Der Effekt der Löslichkeitsvermittlung durch den Extrakt und damit die Penetrationsförderung sind, wie aus Abb. 3.7.2. ersichtlich, auch limitiert und dies äußert sich in einem funktionalen Zusammenhang 2. Ordnung. Auch hier gibt es Löslichkeitsgrenzen für Tryptanthrin in der Extraktmatrix und höhere Dialysatkonzentrationen können dann auch nur noch über eine Vergrößerung der Kontaktfläche auf der Haut erreicht werden.

Diese Erkenntnisse beweisen, dass der Einsatz von Extrakten dem Einsatz von Einzelkomponenten vorzuziehen ist (s. Kap. 3.9. und Kap. 5.).

3.8. Abschätzung der Gewebespiegel von Tryptanthrin

Den Tryptanthrinspiegel, der im Gewebe (c_g) um die Mikrodialysemembran vorlag, kann man mit Hilfe von Gleichung 2 und der ermittelten relativen Recovery (s. Kap. 3.5.1.) abschätzen. Dabei gilt, dass die im Dialysat gemessene Substanz-Konzentration nicht gleich der Konzentration im umliegenden Gewebe der Membran ist, denn durch den steten Fluss der Perfusionsflüssigkeit kommt es nie zu einem vollständigen Konzentrationsausgleich zwischen Perfusionslösung und Interstitium. Daher ist die Konzentration einer Substanz im Dialysat geringer als im Gewebe um die Mikrodialysemembran. Die Substanzkonzentration im Dialysat ist aber der Substanzkonzentration im Gewebe proportional.

$$c_g = c_{\text{dial}} \times 100 / \text{relative Recovery}_{\text{in vitro}} (\%) \quad (\text{Gleichung 2})$$

Die ermittelte *in vitro* Recovery lag bei 90-96 % (s. Kap. 3.5.1.). Damit müssten die Tryptanthrinkonzentrationen in der Extrazellulärflüssigkeit etwas höher als die gemessenen Dialysatkonzentrationen liegen (bei Extraktlg.: 0,04-0,16 ng/μl und bei reiner Tryptanthrinlg.: 0,021-0,11 ng/μl).

Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch, dass man durch Ermittlung der relativen Recovery *in vitro* nicht auf die Recovery *in vivo* zurückschließen kann.

So dient die *in vitro* Wiederfindung der reinen Optimierung der Versuchsparameter der Mikrodialyse wie z.B. Flussrate, Eignung der Perfusionsflüssigkeit und der Testung der Absorptionseigenschaften der zu dialysierenden Substanz (mit bestimmten Eigenschaften wie Molekulargewicht, Ladung, Lipophilie, und Proteinbindung) am eingesetzten Membranmaterial und wird natürlich durch diese Parameter in ihrer Höhe beeinflusst. Weiterhin wird durch diese Versuche auch der Grad der Reproduzierbarkeit bei Verwendung der Mikrodialysemembran ermittelt.

Dagegen wird die *in vivo* Recovery durch Extrapolation auf die Flussrate 0, durch langsame Perfusionsraten, die Bestimmung des Zero-Net-Fluxes oder die Retrodialyse bestimmt (Kovar et al. 1997).

Die Bedingungen beider Arten der Wiederfindung sind so nicht miteinander vergleichbar, da z.B. die Diffusionsrate *in vivo* geringer ist als *in vitro*. Ursache hierfür ist, dass das Hautgewebe ein sehr viel komplexeres Diffusionsmedium darstellt, als die bei *in vitro* Versuchen eingesetzte, wässrige Lösung. Für eine diffundierende Substanz bedeutet dies, dass sie längere Diffusionswege im Gewebe zurücklegen muss und dabei z.B. mit Makromolekülen in Wechselwirkung tritt, die sie abbremsen. So ist der freie Diffusionsweg, der dem in wässriger Lösung bei *in vitro* Versuchen vergleichbar ist, im Gewebe viel geringer und beträgt oft nur ein Bruchteil des gesamten Gewebevolumens, was als Tortuosität bezeichnet wird (Kovar et al. 1997). Außerdem beeinflusst noch physiologische Faktoren wie Blutfluss und Metabolismus das Ausmaß der *in vivo* Recovery (Clough et al. 2002). Damit ist die *in vivo* Recovery kleiner als die *in vitro* Recovery (Groth 1998).

3.9. Zusammenfassung

Ergänzend zu den Ergebnissen der *in vivo* Studien an tierischen Entzündungsmodellen (Recio et al. 2002) und zur Probandenstudie (Heinemann et al. 2004) sollte die Hautpenetration von Tryptanthrin untersucht werden.

Da in diesen Studien die reine Verbindung im Vergleich zum Waidextrakt eine geringere Wirksamkeit hatte, stellte sich die Frage, ob und in welchem Ausmaß Tryptanthrin durch die Haut (Schleimhaut) penetrieren kann. Dazu wurde die kutane Mikrodialyse, eine seit 1990 in

der Dermatologie eingesetzte, minimal invasive Methode zur Untersuchung der Penetration von Substanzen in die Haut, verwendet (Schnetz und Fartasch 2000).

Für dieses *ex vivo* Hautmodell, an dem die Penetration von Tryptanthrin untersucht werden sollte, wurde eine der humanen Haut sehr ähnliche tierische Haut (Hausschwein) ausgewählt. Durch die fehlende Mikrozirkulation konnte die reine Diffusion von Tryptanthrin in die Hautschichten ohne Abtransport in einen systemischen Kreislauf erforscht werden. Dieses *ex vivo* Modell kann dadurch nur für Aussagen zur Penetration von Tryptanthrin herangezogen werden, bei Rückschlüssen auf die komplexeren *in vivo* Bedingungen sind weitere Lebensfunktionen wie Durchblutung der Haut (Blutfluss, Mikrozirkulation) und kutaner Metabolismus in die Betrachtungen mit einzubeziehen (s. auch Kap. 5.).

Durch diese Mikrodialyse-Studie konnte dargestellt werden, dass Tryptanthrin in der Lage ist, sowohl aus reiner Lösung als auch aus einer Extraktmatrix, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß, in die Haut zu diffundieren. So führt eine Erhöhung der Tryptanthrinmenge, die in der Extraktmatrix auf die Haut appliziert wurde, zu einer Erhöhung der Dialysatkonzentrationen während nach Auftragung der reinen Tryptanthrinlösungen (I-IV) stets ähnliche Dialysatkonzentrationen (Bereich 0,05-0,13 ng/ μ l) gemessen wurden. Diese Dosis-Wirkungs-Beziehung konnte nur für die tryptanthrinangereicherte Extrakte nachgewiesen werden.

Die Hauptursache für diese Ergebnisse scheinen lösungsvermittelnde und penetrationsfördernde Effekte von Begleitstoffen der Extraktmatrix für das Tryptanthrin zu sein, die in reiner Lösung nicht vorhanden sind.

Für die weitere Verwendung von Tryptanthrin ist die Auswahl bzw. Entwicklung eines geeigneten technologischen Vehikels, das diese schlecht lösliche Verbindung in Lösung zu halten vermag, von großer Bedeutung.

Viel effektiver bleibt jedoch der Einsatz des Waid-Extraktes, da seine anti-inflammatorische Wirkung ein Zusammenspiel verschiedener aktiver Verbindungen ist, deren Wirkung durch Extraktbegleitstoffe modifiziert wird (s. Kap. 5.).

Im folgenden Kapitel wird nun eine weitere, anti-inflammatorisch wirksame Extraktkomponente vorgestellt, die sehr schnell durch Kopplung von Mikrofraktionierung im analytischen Maßstab und Bioassay identifiziert werden konnte. Sie ist ein gutes Beispiel dafür, dass einfache Extraktbegleitstoffe in der Lage sind, die Effekte der Hauptverbindungen zu modulieren oder zu unterstützen.

4. Identifizierung eines weiteren Inhibitors der 5-Lipoxygenase

In einem pharmakologischen Screening gegen Ziele von Entzündungskaskaden wurde bereits das anti-inflammatorische Potential des lipophilen Waidextraktes nachgewiesen (s. Kap. 2.2.). Daraufhin wurde die COX-2 inhibierende Wirkung dem Alkaloid Tryptanthrin zugeordnet. Die 5-LOX hemmende Aktivität konnte aber nicht nur auf die Anwesenheit von Tryptanthrin (IC_{50} von Tryptanthrin im 5-LOX-Assay = $0,15 \mu M$) beruhen und es wurde damals vermutet, dass noch nicht identifizierte Verbindungen im Extrakt existieren, die ebenfalls die Hemmung des Enzymes 5-Lipoxygenase hervorrufen (Danz et al. 2002a, 2002b).

Für eine effektive Suche und eine schnelle Identifizierung der aktiven Extraktkomponente wurde die Methode der Mikrofraktionierung (Hamburger und Hostettmann 1991) eingesetzt.

4.1. Mikrofraktionierung

Die Mikrofraktionierung (s. Kap. 13.1.) wurde auf einer analytischen HPLC (HPLC-System 3, s. Kap. 14.3.) ausgeführt. Dazu wurde der *Isatis*-SFE-Extrakt (Charge: 01/2002) gelöst und über eine Säule (RP-18 LiChrospher 125 x 4 mm i.d.) aufgetrennt. Um eine Übersicht über die Verteilung der Aktivität im Extrakt zu bekommen, wurden in einem ersten Durchgang 10 Fraktionen zu 3 min gesammelt und im 5-LOX-Assay getestet. Die IC_{50} des Gesamtextraktes konnte im 5-LOX-Assay mit $6 \text{ ng}/\mu l$ bestimmt werden. Alle Bioassay-Untersuchungen wurden durch die Firma Vitapant (Witterswil, Schweiz) ausgeführt (s. Kap. 13.2.1.).

Im ersten Durchgang dieser Mikrofraktionierung konnte eine Inhibition der 5-Lipoxygenase in den Fraktionen 5 (Zeitraum 12-15 min), 8 (Zeitraum 21-24 min) und 9 (Zeitraum 24-27 min) festgestellt werden. Die Verteilung der Aktivität im Bioassay wurde in zeitliche Korrelation zum entsprechenden HPLC-Chromatogramm (Wellenlänge 220 nm) gebracht (siehe Abb. 4.1.1.a):

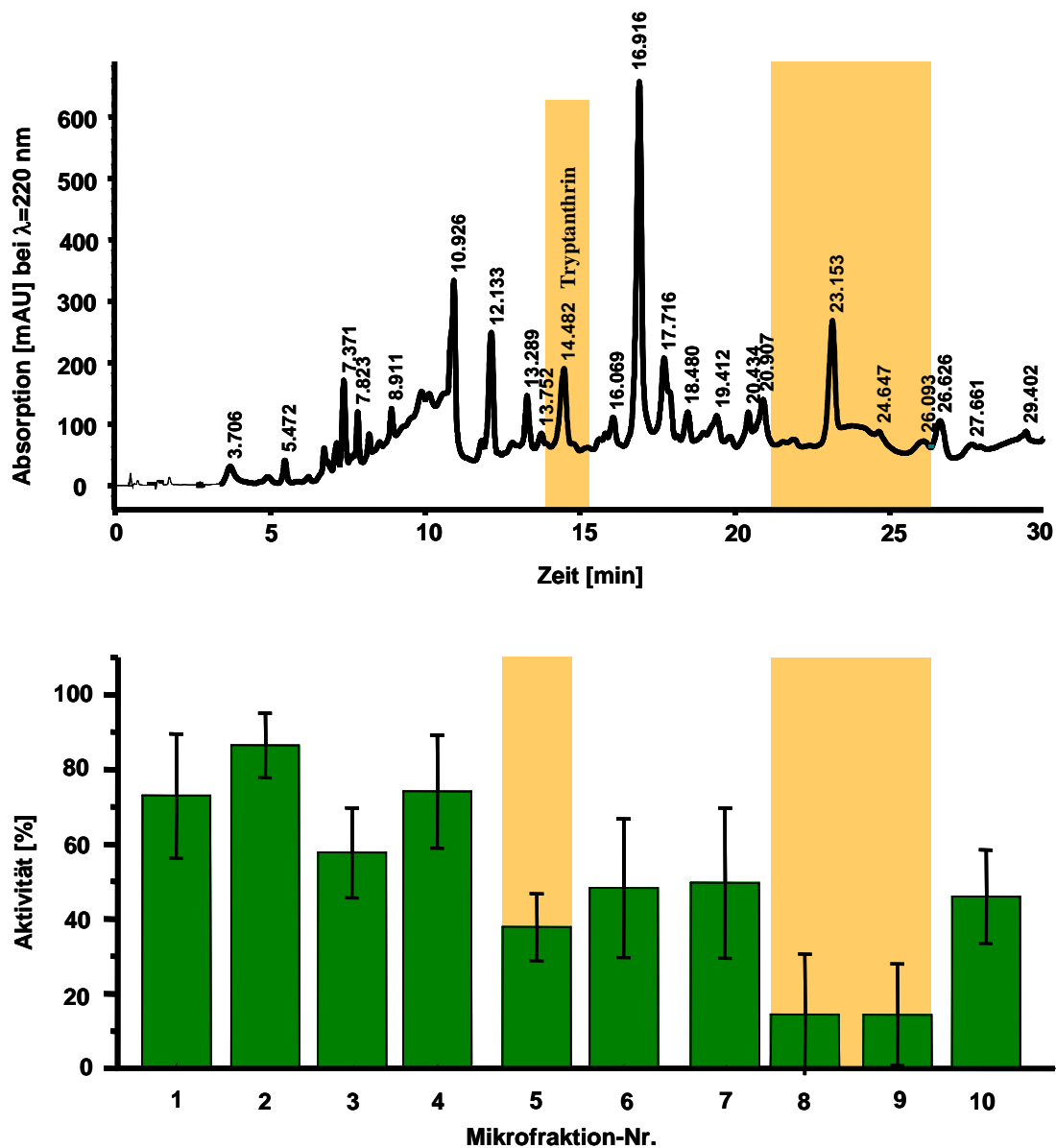


Abb. 4.1.1.a: Erste Fraktionierung (10 Fraktionen zu 3 min)

Die in Fraktion 5 festgestellte Aktivität korreliert mit der Retentionszeit von Tryptanthrin ($t_R = 14,48$ min). Wie bereits bei Danz et al. (2002b) beschrieben, ist Tryptanthrin ein starker Inhibitor der 5-Lipoxygenase ($IC_{50} = 0,15 \mu M$) und dem klinisch eingesetzten Zileuton äquivalent ($IC_{50} = 0,35 \mu M$).

Die Hauptaktivität des Extraktes gegen die 5-Lipoxygenase wird jedoch durch die Fraktionen 8 und 9 hervorgerufen. Um die aktive(n) Komponente(n) dieser Fraktionen weiter einzugrenzen, wurde in einem zweiten Durchgang der auf der Säule aufgetrennte Extrakt peak-kontrolliert gesammelt. 11 Fraktionen (s. Abb. 4.1.1.b) konnten so gewonnen werden, die erneut im Bioassay getestet wurden. Dabei stellte sich heraus, dass die Aktivität durch

einen Einzelpeak ($t_R = 23,15$ min, s. HPLC-Chromatogramm), als Fraktion 8-2 bezeichnet, hervorgerufen wird:

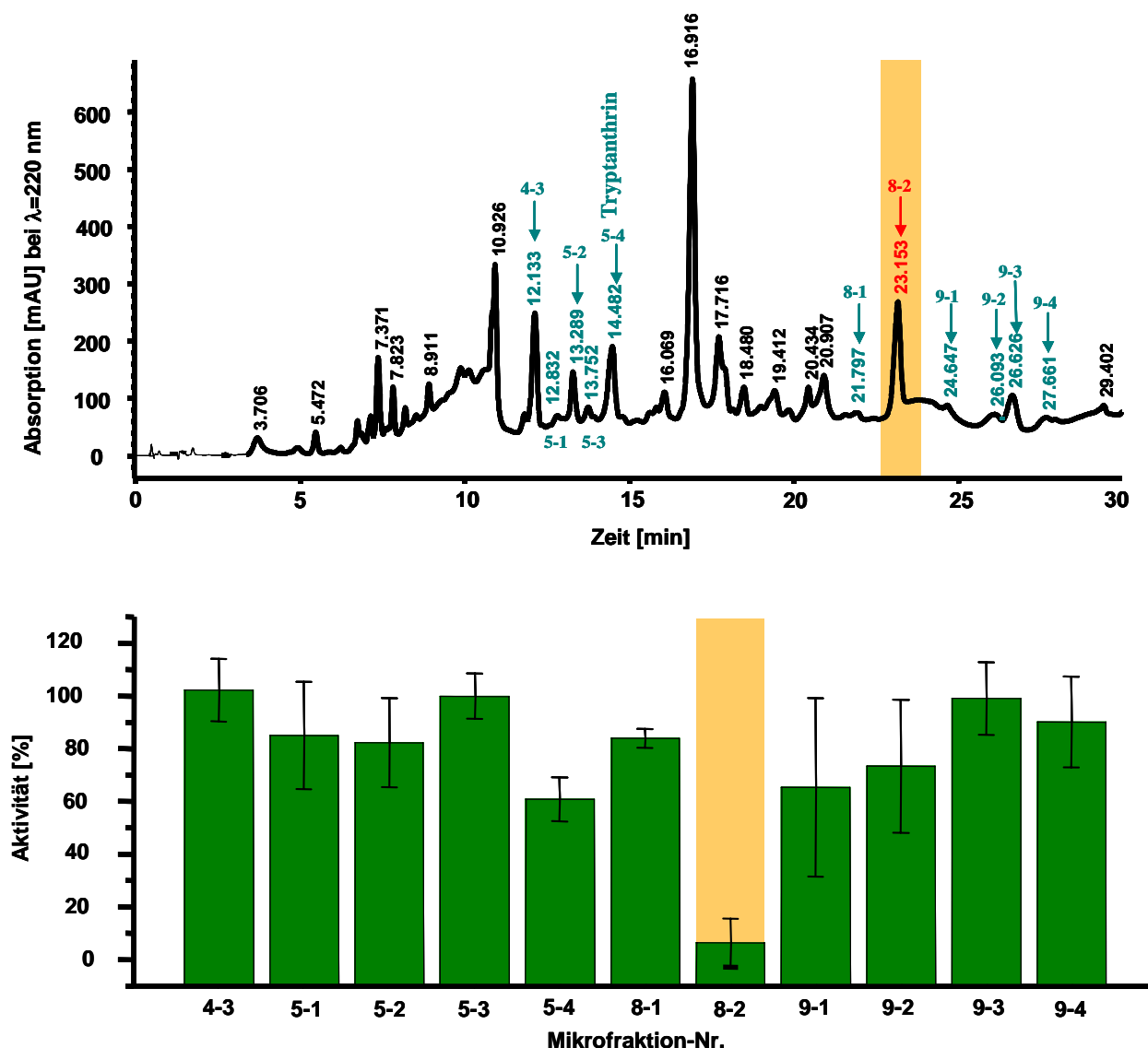


Abb. 4.1.1.b: Zweite Fraktionierung (peak-kontrolliert)

Um erste Daten über die aktive Komponente der Fraktion 8-2 zu erhalten, wurde zunächst ein Massenspektrum aufgenommen (HPLC-System 1b, s. Kap. 14.3., ESI-MS-Bedingungen s. Kap. 15.1.). Die unbekannte Substanz ließ sich sowohl im positiven mit der Masse $m/z = 279$ amu ($[M+H]^+$) als auch im negativen mit einer Masse von $m/z = 277$ amu ($[M-H]^-$) ionisieren. So beträgt das Molekulargewicht dieser Verbindung 278 amu. Da bereits in einer anderen Arbeit in den Wurzeln von *Angelica pubescens* eine Verbindung dieser Masse mit inhibitorischem Effekt auf die 5-Lipoxygenase gefunden wurde (Liu et al. 1998), erhöhte

sich der Verdacht, dass es sich hier ebenfalls um α -Linolensäure handeln könnte. In der Literatur wird das Molekulargewicht dieser ungesättigten Fettsäure (9,12,15-Octadecatriensäure, $C_{18}H_{30}O_2$) mit 278,44 g/mol angegeben (Hagers Handbuch). Eine GC-MS Untersuchung nach Derivatisierung der α -Linolensäure zum verdampfbaren Methylester konnte diese Vermutung eindeutig bestätigen (persönliche Mitteilung Dr. Jahreis, Jena).

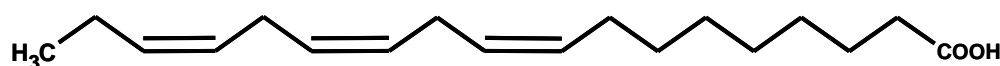


Abb.4.1.2.: Struktur der α -Linolensäure

4.2. Ergebnis der Mikrofraktionierung

Durch die Mikrofraktionierung des SFE-Extraktes (Charge: 01/2002) konnte die für die 5-LOX-Hemmung hauptsächlich verantwortliche Komponente, die α -Linolensäure identifiziert werden. Als Substrat des Enzymes 5-Lipoxygenase ist sie in der Lage, die Arachidonsäure kompetitiv von der Substratbindungsstelle des Enzyms zu verdrängen. Damit wird die Entstehung der als Entzündungsmediatoren wirksamen Leukotriene unterbunden (s. Kap. 2.).

Auch Fraktion 9 zeigte in der ersten 5-Lipoxygenase-Testung eine inhibitorische Aktivität. Da es sich bei Fraktion 8 und 9 um sehr lipophile Extraktverbindungen handelt, die nur mit 90-100 % Acetonitril von der RP-18-Säule eluieren, ist es denkbar, dass die in Fraktion 9 zunächst gefundene Aktivität durch weitere lipophile Substanzen (andere ungesättigte Fettsäuren) hervorgerufen wird. In *Isatis* sind eine Reihe solcher Fettsäuren beschrieben worden (Hartleb und Seifert 1995).

Eine Zusammenfassung über die Resultate der Mikrofraktionierung und die Ergebnisse der Mikrodialyse ist im folgenden (Kap. 5.) gegeben.

5. Schlussfolgerungen zu den Ergebnissen der Mikrodialyse und zur Identifizierung der α -Linolensäure als Inhibitor der 5-Lipoxygenase

In früheren Arbeiten konnte bereits nachgewiesen werden, dass der anti-inflammatorische Effekt des lipophilen Waid-Extraktes durch den Angriff an verschiedenen Punkten im komplexen Entzündungsgeschehen verursacht wird. Dazu gehören die Inhibition der Enzyme COX-2 und 5-LOX der Arachidonsäurekaskade (Danz et al. 2002a, 2002b) und die Hemmung der induzierbaren NO-Synthase (Ishihara et al. 2000) durch Tryptanthrin. Die Inhibition der Leukocytelastase und die Freisetzung von Histamin und Serotonin wird durch noch nicht identifizierte Extraktverbindungen hervorgerufen (Hamburger 2002).

Zu den Ergebnissen des pharmakologischen Screenings kommen nun weitere Erkenntnisse hinzu, die das Wirkprofil des *Isatis*-Extraktes stetig vervollständigen. Zum einen sind dies die Resultate der Hautmikrodialyse-Studie (s. Kap. 3.) sowie die Identifizierung der α -Linolensäure als 5-Lipoxygenase-inhibierende Extraktkomponente (s. Kap.4.), zum anderen ergänzen auch die Ergebnisse der Probandenstudie an der Hautklinik Jena (Heinemann et al. 2004) und die *in vivo* Studien am Tiermodell (Recio et al. 2002) das Gesamtbild der pharmakologischen Aktivität des Waidextraktes.

So konnte nachgewiesen werden, dass die α -Linolensäure am anti-inflammatorischen Effekt des Extraktes neben Tryptanthrin über eine Hemmung der 5-Lipoxygenase beteiligt ist. Diese mehrfach ungesättigte Fettsäure blockiert das leukotrien-bildende Enzym als Konkurrenz-Substrat, so dass andere Verbindungen wie die Arachidonsäure nicht oder nur vermindert zu Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene) umgesetzt werden können. Die Art der Inhibition der COX-2 und 5-LOX durch Tryptanthrin ist bislang noch unbekannt.

Da der Extrakt ein Vielstoffgemisch darstellt, ist es denkbar, dass die anderen, noch unbekannten pharmakologisch aktiven Extraktverbindungen, die die Histamin- und Serotoninfreisetzung sowie die Leukocytelastase hemmen, ebenfalls durch anwesende Begleitstoffe des Extraktes in ihrer Wirkung unterstützt werden.

Bewiesen werden konnte, sowohl durch die Resultate der tierpharmakologischen Studien (Recio et al. 2002) als auch durch die Probandenstudie an der Hautklinik Jena (Heinemann et al. 2004), dass die anti-inflammatorische Aktivität des Extraktes besser (signifikant) ist als die der Reinsubstanz Tryptanthrin. Eine Erklärung für diese Ergebnisse wurde durch die

Untersuchung der Hautpenetration von Tryptanthrin aus reiner Lösung im Vergleich zum Extrakt an einem *ex vivo* Modell mit kutaner Mikrodialyse (s. Kap. 3.) gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass nach Auftragung des Tryptanthrin-angereicherten Extraktes auf die Haut höhere Gewebespiegel an Tryptanthrin, gemessen als Dialysatkonzentrationen, im Vergleich zur Reinsubstanz erreicht werden. Auf diese Weise konnte ein lösungsvermittelnder und penetrationsfördernder Effekt des Extraktes belegt werden.

Das dieses Modell nur für prinzipielle Aussagen der Penetrationsfähigkeit von Tryptanthrin genutzt werden kann, zeigen die Ergebnisse einer Mikrodialyse-Studie an 3 Probanden. Hier konnte bei keinem Probanden Tryptanthrin in den Dialysaten nach Auftragung der acetonischen, gesättigten Tryptanthrinlösung auf die gesunde humane Haut, nachgewiesen werden. Erst nach einer forcierten Hautirritation mit SLS (Störung der Barrierenfunktion des Stratum corneums) wurde Tryptanthrin bei einem Probanden nach ca. 60 min im Dialysat (an der Nachweisgrenze) festgestellt.

Ursache dafür könnten die schlechten Absorptionseigenschaften humaner Haut im Gegensatz zu tierischer Haut (Bronaugh et al. 1982, Riviere et al. 1995), das sehr kleine Probandenkollektiv, die Metabolisierung der Substanz, vor allem aber den durch die Mikrozirkulation (Andersson et al. 1994) des oberflächlichen Blutgefäßnetzes (Stratum papillare) bedingten Abtransportes der Tryptanthrinmoleküle sein.

Die Metabolisierung einer Substanz und der Abtransport dieser in den systemischen Kreislauf durch die Mikrozirkulation sind Merkmale lebender Haut, die den Nachweis einer penetrierenden Substanz im Gegensatz zum *ex vivo* Modell (totes Gewebe) deutlich erschweren.

Ein weiterer, wichtiger Aspekt für die anti-inflammatorische Aktivität des Extraktes bzw. Tryptanthrin ist der zeitliche Abstand zwischen Induktion einer Entzündung und Anwendung durch orale oder topische Applikation. Wie bereits in Kap. 2.3. dargelegt, wurde bei den tierpharmakologischen Untersuchungen (Rattenpfotenödem) für den Waidextrakt eine dosisabhängige Hemmung der Ödembildung im Zeitraum von 1 bis 3 h nachgewiesen werden, während für reines Tryptanthrin (Dosen ab 70 mg/kg) keine eindeutige Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit festgestellt wurde. Nur der Waidextrakt war fähig, die Ödembildung bereits in der ersten Stunde nach Induktion zu hemmen. Dies ist ein Indiz für die Beeinflussung der Serotonin – und Histaminfreisetzung durch andere, noch nicht identifizierte Extraktkomponenten (Recio et al. 2002).

Bei der Probandenstudie der Hautklinik Jena (Heinemann et al. 2004) zeichnete sich ein ähnliches Bild ab. Auch hier war die Auftragung des Extraktes eher in der Induktionsphase einer Entzündungsreaktion sinnvoll. Denn wurde die Haut bereits in der irritativen Phase mit *Isatis*-Extrakt behandelt, so konnte das Ausmaß der Entzündungsreaktion verringert werden, wurde jedoch der Extrakt resp. Tryptanthrin erst nach Abschluss der Irritation mit SLS appliziert, so konnte keine beschleunigte Heilung der Entzündung festgestellt werden. Auch hatte Tryptanthrin keinen signifikanten Effekt im Vergleich zum Extrakt, der eine wesentliche geringere Tryptanthrinkonzentration aufwies.

Diese Ergebnisse *in vivo* zeigen, dass der anti-inflammatorische Effekt des Waidextraktes neben der Hemmung der Enzyme der Arachidonsäurekaskade (COX-2, 5-LOX) vor allem auf die Beeinflussung früher Phasen einer Entzündungsreaktion (z.B. Histamin und Serotoninfreisetzung) zurück zu führen ist.

Ausblick

Da in der frühen Phase einer Entzündungsreaktion die Freisetzung von Histamin und Serotonin stattfindet und der Waidextrakt offensichtlich die Ausschüttung dieser Mediatoren effektiv beeinflussen kann, wäre es interessant, die Histamin- bzw. Serotoninspiegel in der Haut durch kutane Mikrodialyse zu ermitteln. Dazu könnte man einige Hautareale mit Extrakt (oder Testsubstanzen) vorbehandeln, während andere Hautareale als Vergleich unbehandelt blieben. Nach Induktion einer Entzündung könnten so die Hautgewebespiegel dieser Entzündungsmediatoren über einen bestimmten Zeitraum ermittelt werden. Wichtig ist jedoch zunächst die Identifizierung der für die Hemmung der Leukocytinelastase sowie Histamin- bzw. Serotoninfreisetzung verantwortlichen Extraktkomponenten.

6. Untersuchung des Gehaltes an indolischen Komponenten in den Extrakten von *Isatis tinctoria* L. in Abhängigkeit von Erntezeitpunkt und Nacherntebehandlung

6.1. Anbau, Züchtung und Ernte verschiedener Waidherkünfte

Die Entwicklung eines pflanzlichen Arzneimittels mit einer hochwertigen pharmazeutischen Qualität besteht aus vielen einzelnen Schritten. Ein wichtiger Teilschritt ist die Auswahl der Herkünfte bzw. Varietäten einer Art. Dabei muss bedacht werden, dass es zwischen den Herkünften einer Art unter Umständen große Unterschiede im Sekundärmetabolitspektrum geben kann. Beim Färberwaid wurde durch Gilbert et al. (2002) eine hohe genetische Diversität (s. Kap. 1.3.1.) festgestellt, dies kann zu einer großen Variabilität im Sekundärmetabolit - Spektrum führen (Fiehn 2002, Hamburger 2002).

Aus züchterischer Sicht dagegen muss die ausgewählte Art bereits im Vorfeld über Jahre bearbeitet werden, dabei sind bestimmte Auslesekriterien (definierter Phänotyp, Wucherscheinung etc.) zu erfüllen. Wichtig ist auch, dass die ausgewählte und angebaute Art z.B. gegen Schädlinge oder Erkrankungen (Pilzbefall etc.) relativ resistent ist.

Ein weiterer Aspekt ist die Auswahl des geeigneten Erntezeitpunktes, denn das Spektrum an Inhaltsstoffen variiert mit Witterung und Jahreszeit. Von sehr großer Bedeutung sind aber auch die Bedingungen nach der Ernte, denn die pflanzlichen Stoffwechselvorgänge enden noch nicht direkt nach dem Schnitt. Ist noch Wasser in den Geweben (Zellen) enthalten, dann können sowohl enzymatische Umsetzungen als auch nicht-enzymatische Ab- und Umbauvorgänge stattfinden. Die Geschwindigkeit des Wasserverlustes, d.h. die Trocknungsbedingungen (Temperatur) und auch die Lagerbedingungen bis zur endgültigen Weiterverarbeitung der Pflanze bzw. Droge beeinflussen das endgültige Inhaltsstoffmuster.

Des weiteren sind natürlich auch die Extraktionsbedingungen im Hinblick auf die Anreicherung einer bzw. mehrerer Extraktkomponenten entsprechend zu modifizieren (Hänsel et al. 1999).

Nachdem Tryptanthrin als dualer COX-2 und 5-LOX-Hemmer identifiziert worden war, richtete sich die Aufmerksamkeit auf den Gehalt dieser aktiven Komponente in den Extrakten verschiedener Waidherkünfte. Nach einem Screening, in dem 67 *Isatis*-Proben aus aller Welt

auf den Tryptanthrin-Gehalt untersucht wurden, zeigte sich, dass der Tryptanthringehalt dieser Proben sehr großen Variationen ($0,56$ bis $16,74 \times 10^{-3} \%$) unterliegt (Danz 2002a).

Aus den untersuchten Waidproben wurden anschließend 5 Herkünfte (Thüringer Waid, Jenaer Waid, Kieler Waid, Französischer Waid, Schweizer Waid) ausgewählt, die durch die Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft angebaut wurden. Um die Wachstumsbedingungen für alle ausgewählten Waidherkünfte gleich zu halten, wurden die Waidpflanzen in Parzellen (s. Abb. 6.1.1.) randomisiert angebaut. Der Ursprung des Saatgutes und die Bedingungen des Anbaus sind im Kap. 8. (Materialien und Methoden) aufgeführt.

Diese 5 Herkünfte wurden auf den Gehalt an Tryptanthrin und auf den Gehalt an Indoxylderivaten (s. Kap. 6.3.) in Abhängigkeit von Erntezeitpunkt und Nacherntebedingungen untersucht.



Abb. 6.1.1.: Parzelle mit Waidpflanzen, 1. Jahr nach Aussaat (Quelle: M. Hamburger 2001)

Der Schnitt der Waidblätter erfolgte in der jeweils ersten Vegetationsperiode nach Aussaat mit einem Grünfütterer. Probennahmen erfolgten im Juli und August 2001 sowie im Juni und August 2002. Die unmittelbar nach der Ernte entnommenen Proben wurden sofort unterschiedlichen Trocknungsbedingungen zugeführt. Um das Inhaltsstoffmuster, das kurz nach der Ernte in den frischen Blättern vorliegt, festzuhalten, wurde je 500 g jeder Herkunft sofort mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend gefriergetrocknet. Je 500 g Blattmaterial jeder Herkunft wurden außerdem bei Raumtemperatur und bei 40°C (Umlufttrockenschrank) getrocknet (s. Kap. 9.). Während der Trocknung wurden die Umgebungstemperatur und relative Luftfeuchte aufgezeichnet und zur Überprüfung des Trocknungsfortschrittes die Blattmasse protokolliert. Die getrockneten Blätter wurden später (September 2003) durch beschleunigte Lösungsmittelextraktion (ASE, s. Kap. 10.1.) extrahiert, das Extraktionsmittel aus den Extraktlösungen durch Evaporation entfernt und die gewonnenen Extrakte bis zur Quantifizierung tiefgekühlt gelagert (-32°C).

6.2. Quantifizierung von Tryptanthrin in Extrakten von *Isatis tinctoria* L.

6.2.1. Analytik

Für das Screening der Extrakte wurde die für die Untersuchung der Dialysate in der Hautmikrodialyse entwickelte HPLC-MS-Analytik genutzt (s. Kap. 3.6.). Dort ist die Validierung dieser Methode aufgeführt (s. Kap. 3.6.3.). Zu Beginn und am Ende dieser Quantifizierungsreihe wurde je eine Kalibrierkurve, bestehend aus 5 Kalibrierpunkten (s. Kap. 17.2.) aufgenommen (je Kalibrierpunkt $n = 5$). Es konnte wieder eine sehr gute Linearität festgestellt werden (s. Abb. 6.2.1.1.). Die relativen Standardabweichungen der Kalibrierpunkte lagen zwischen 0,8 bis 3,0 %.

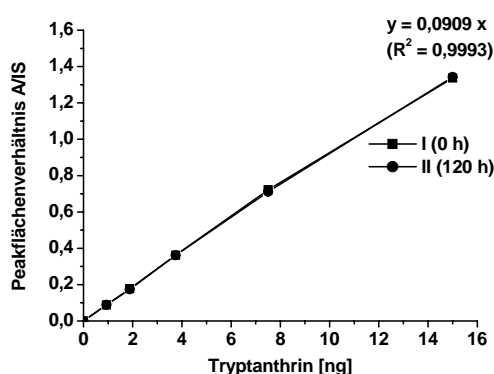


Abb.6.2.1.1.: Kalibrierkurven I und II

6.2.2. Quantifizierung von Tryptanthrin

Für die Vermessung wurden die Extrakte in Methanol gelöst, mit internem Standard versetzt und 3-fach vermessen (Probenvorbereitung s. Kap. 17.2., Messungen analog zu Dialysaten, s. Kap. 12.7.). Der Gehalt an Tryptanthrin wurde auf den Extrakt berechnet, um die Daten mit den vorangegangenen Quantifizierungen besser vergleichen zu können (Danz et al. 2002a).

Wie aus der Grafik ersichtlich (Abb. 6.2.2.1.), sind die geringsten Tryptanthrinmengen in den gefriergetrockneten Proben gefunden worden, die das Abbild des Inhaltstoffmusters zum Erntezeitpunkt darstellen. Vergleicht man die gefriergetrockneten Proben aus dem Jahr 2001

und 2002 miteinander, dann kann man feststellen, dass der Gehalt in den Proben aus 2001 etwas höher liegt (0,034-0,055 %) als in den Proben aus 2002 (0,008-0,017 %). Dies könnte in der um ein Jahr verlängerten Lagerungsdauer bei Raumtemperatur liegen. Der Gehalt an Tryptanthrin steigt generell an, wenn man die Blätter nach der Ernte bei höheren Temperaturen trocknet:

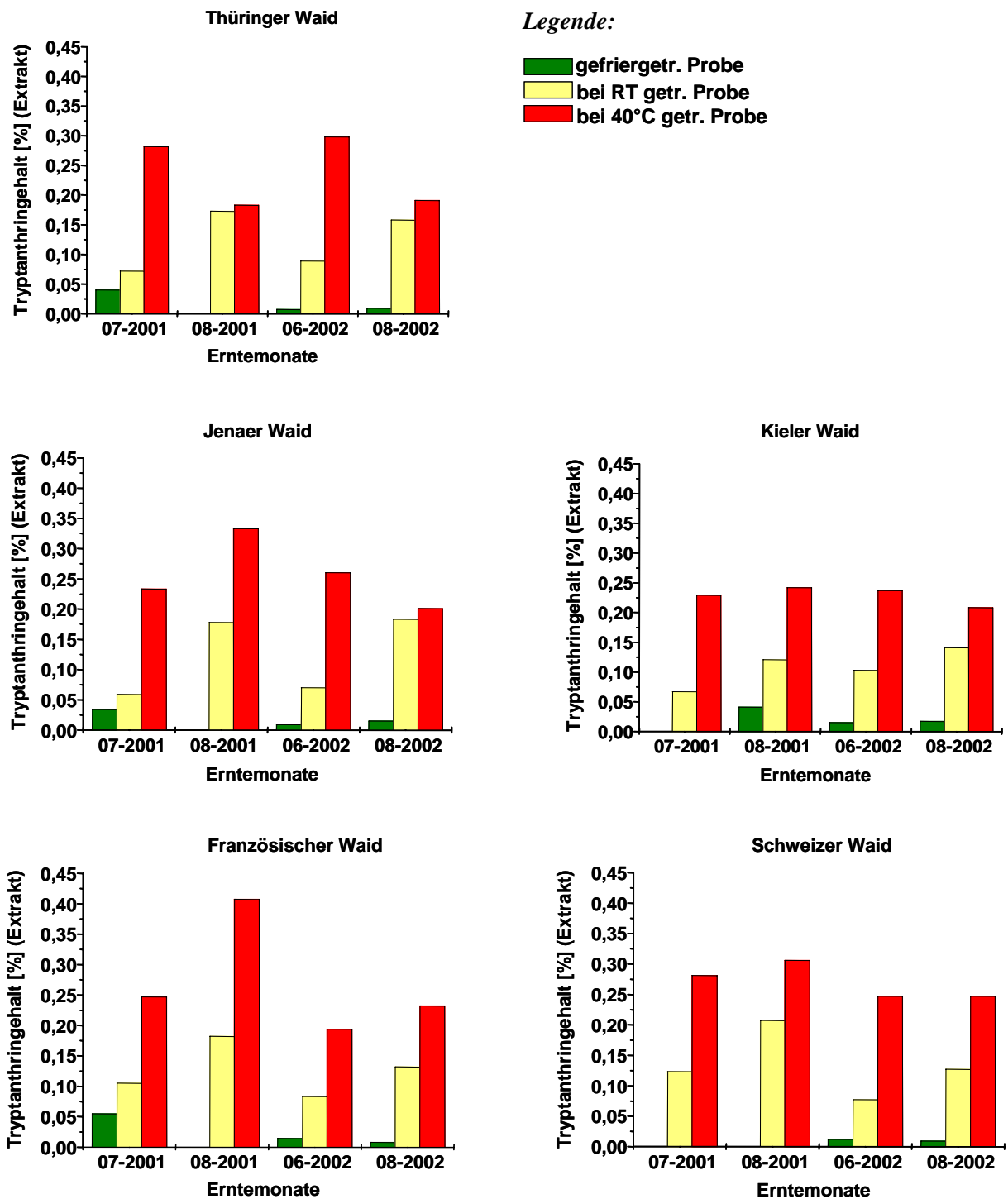


Abb. 6.2.2.1.: Gehalt an Tryptanthrin (ber. auf Extrakt) in den verschiedenen Waidherkünften

In den Proben, die bei Raumtemperatur getrocknet wurden, findet man Gehalte von 0,06-0,207 %, der Gehalt in später geernteten Proben (August) ist höher (0,12-0,20 %) als in den früheren Erntemonaten Juni oder Juli (0,06-0,12 %).

Die etwas längere Lagerung für die Proben aus 2001 im Vergleich zu 2002 hat bei den Raumtemperatur-getrockneten Proben keinen nennenswerten Effekt mehr.

Die höchsten Gehalte an Tryptanthrin sind jedoch in den bei 40°C getrockneten Proben nachgewiesen worden (0,18-0,33 %).

Diese Daten zeigen eindeutig, dass der Gehalt an Tryptanthrin (s. Abb. 6.2.2.2.) sowohl vom Erntezeitpunkt, viel stärker dagegen von den Bedingungen des Trocknungsprozesses abhängig ist. Tryptanthrin ist demnach eine Verbindung, die zwar schon in der Pflanze in sehr geringen Mengen (0,008-0,018 %) vorhanden ist, der größte Anteil wird jedoch erst während der Trocknung durch erhöhte Temperaturen gebildet. Auch während der Lagerung der getrockneten Blätter findet eine Bildung des Alkaloids statt.

Noch ist nicht genau bekannt, wie die Bildung von Tryptanthrin abläuft. Eine Beteiligung von Enzymen kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Da aber die Entstehung von Tryptanthrin bei der Trocknung von 40°C am intensivsten erfolgt und auch während der Lagerung der getrockneten Droge (in geringerem Ausmaß) andauert, ist eine spontane Kopplung von zwei Indolkörpern (Isatin) unter Einwirkung von Luftsauerstoff ähnlich der Synthese von Tryptanthrin aus Isatin in Gegenwart eines Oxidationsmittels (KMnO₄) nach Friedländer und Roschdestwensky (1915) denkbar (s. auch Kap. 7.1.).

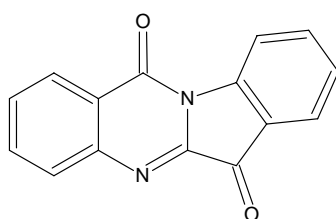


Abb. 6.2.2.2.: Tryptanthrin

Die Indoxylderivate Isatan A/B (s. Kap. 6.3.1., 6.3.2.) könnten Vorstufen für Tryptanthrin darstellen. Ein Indiz dafür ist das Verschwinden dieser indolischen Intermediate bei der Trocknung der Waidblätter nach der Ernte (s. Kap. 6.4.1.) und ein Anstieg des Tryptanthringehaltes durch Trocknung bei Raumtemperatur bzw. 40°C. Diese Beobachtung

ist aber nur mit intaktem Blattmaterial möglich. Werden die frischen Blätter zerkleinert, dann kommt es zur Zerstörung der Gewebe- bzw. Zellstrukturen. Die freigesetzten Indoxylderivate kommen auf diese Weise mit den bakteriellen β -D-Glucosidasen (s. Kap. 1.3.3.) in Verbindung und werden durch diese gespalten. Frei werdendes Indoxyl reagiert dann spontan unter Einwirkung von Luftsauerstoff zu den Farbpigmenten Indigo/Indirubin. Dies ist auch die Ursache dafür, dass in den Proben, die aus fermentierten Waidblättern (s. Kap. 9.) gewonnen wurden, kein Tryptanthrin nachweisbar war.

In Hydrolyseversuchen mit Indican, Isatan B und Isatan A (s. Kap. 18.) konnte gezeigt werden, dass Isatan B und Indican durch die Enzyme β -D-Glucosidase und β -Glucuronidase gespalten werden und zu Indigo reagieren. Isatan A wurde durch diese beiden Enzyme nicht umgesetzt (s. Kap. 6.3.2., „Zuordnung des Zuckerrestes“), da der Malonylrest die enzymatische Umsetzung evtl. sterisch behindert. Da Isatan A jedoch sehr instabil ist und relativ schnell zu Isatan B zerfällt (s. Kap. 6.3.2), ist es denkbar, dass Isatan A über Isatan B abgebaut wird und anschließend durch die Enzyme in Indoxyl und Zuckerrest gespalten wird. Die Zerstörung des Blattgewebes, so wie es bereits früher bei der Herstellung der Waidbälle (s. Kap. 1.3.3.) mit Mahlsteinen erfolgte, scheint die Bildung der Farbpigmente (Indigo/Indirubin) zu forcieren. Bleibt das Blattgewebe intakt, so werden die Vorstufen in andere sekundäre indolische Verbindungen umgebaut (s. Kap. 7.).

6.3. Quantifizierung von Indigoprecursoren in methanolischen *Isatis* – Extrakten

Das Ziel dieser Untersuchungen war, den Gehalt und das Spektrum der Indoxylderivate Isatan A, Isatan B und Indican in Abhängigkeit von Erntezeitpunkt und Nacherntebehandlung zu untersuchen. Wie bereits bei der Gehaltsbestimmung von Tryptanthrin in Extrakten von *Isatis tinctoria* festgestellt (s. Kap. 6.2.2.), gibt es nach der Ernte noch massive Umsetzungen und Abbauvorgänge im Sekundärstoffwechsel der Pflanze. Im Fall von Tryptanthrin konnte ein Anstieg des Gehaltes mit steigender Temperatur bei der Trocknung der Waidblätter gezeigt werden. Diese Veränderungen im Stoffwechsel der Pflanze während des Trocknungsprozesses betreffen auch den Gehalt der Indoxylderivate (Indigovorstufen).

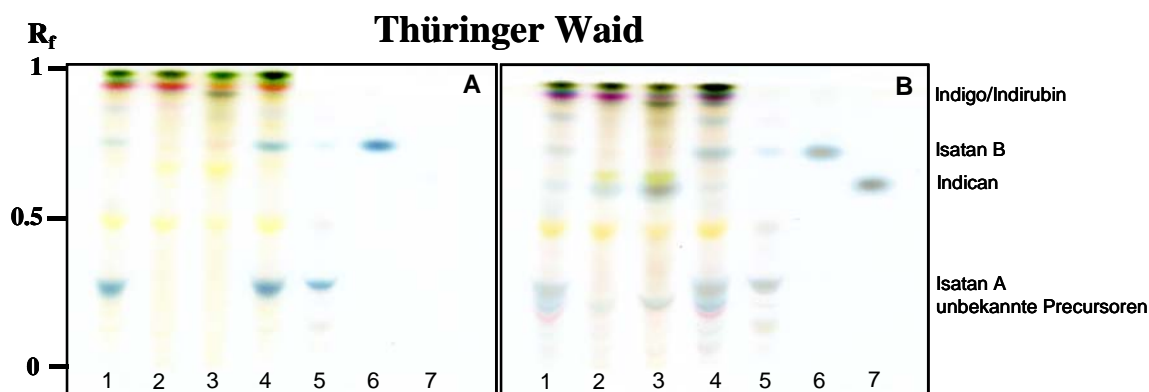
6.3.1. Entdeckung neuer Precursoren durch Dünnschichtchromatographie

Bisher waren nur das Indican und Isatan B als Indigo-Precursoren im Waid bekannt. Bei dünnschichtchromatographischen Vorversuchen, die der Entwicklung und Optimierung von Bedingungen dienen sollten, wurde durch Besprühen mit 5 %iger NaOH oder 5 %iger HCl neben wenig Isatan B ($R_f = 0,76$) und Indican ($R_f = 0,71$) eine weitere, sehr komplexe, farbbildende Zone ($R_f = 0,25-0,33$) mit höherer Polarität als Isatan B und Indican entdeckt. Durch die Behandlung mit 5 %iger NaOH verhielt sich der obere Teil dieser polaren Zone ($R_f = 0,30-0,33$) dem Isatan B identisch und ergab eine sehr intensive, tiefblaue Indigofärbung. Nach Detektion mit 5 %iger HCl färbte sich der obere Teil der polaren Zone in gleicher Weise wie Isatan B an und zusätzlich dazu erschien ein weiteres komplexes Farbmuster im unteren Teilbereich dieser Zone ($R_f = 0,25-0,30$), die der Farbbildung des Indicans (graublau) sehr ähnlich war. Um weitere Strukturhinweise zu erhalten, wurde auch mit Ehrlichs Reagenz (4-Dimethylaminobenzaldehyd, Nachweis von Indolkörpern) besprüht, hierbei färbten sich Isatan B, Indican und die gesamte polare Zone der neuen unbekannten Verbindungen gelb-braun an. Auch hier konnte man wieder Unterschiede innerhalb der gesamten polaren Zone sehen. So entsprach die Farbe der oberen Teilzone ($R_f = 0,30-0,33$) der des Isatan B während die Farbe der unteren Teilzone ($R_f = 0,25-0,30$) der Färbung des Indicans entsprach.

Interessant war in diesem Zusammenhang auch, dass offensichtlich nur sehr wenig Isatan B und Indican im Vergleich zu den neuen Precursoren vorlag, von denen Isatan A als Haupt-Precursor isoliert und strukturell aufgeklärt werden konnte (s. Kap. 6.3.2.).

In den gefriergetrockneten Proben (s. Abb. 6.3.1.1.) konnte ein sehr vielfältiges Spektrum dieser Indoxylderivate gefunden werden. Neben den bekannten Precursoren Isatan B und Indican ist auch der Haupt-Precursor, das Isatan A, vorhanden. Durch Trocknung bei Raumtemperatur sieht man nur noch Indican und weitere, noch unbekannte Vorstufen des unteren Bereiches ($R_f = 0,25-0,30$) der polaren Zone. Diese sind im Gegensatz zum Isatan A/B, noch in den bei Raumtemperatur oder bei 40°C getrockneten Blattproben in geringer Konzentration zu finden.

So sind Isatan A und Isatan B sehr instabile Intermediate, die bei der Trocknung der Blätter vollständig abgebaut werden, während Indican und die Indican-ähnlichen, noch nicht identifizierte Verbindungen relativ stabil sind.



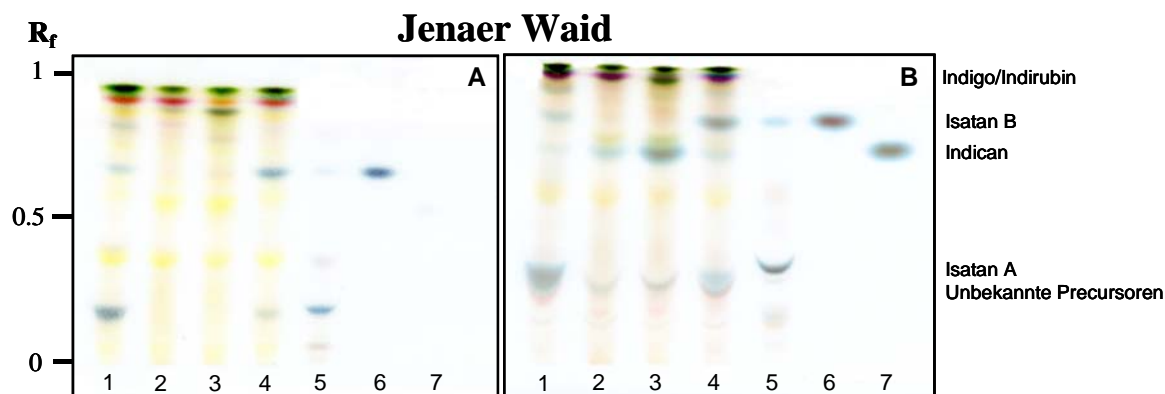
A Behandlung mit 5%iger NaOH

B Behandlung mit 5%iger HCl

Legende:

- 1 Ernte 06/02, Blätter schockgefroren, lyophilisiert
- 2 Ernte 06/02, Blätter bei Raumtemp. getrocknet
- 3 Ernte 06/02, Blätter bei 40°C getrocknet
- 4 Ernte 08/02, Blätter schockgefroren, lyophilisiert
- 5 Referenz Isatan A
- 6 Referenz Isatan B
- 7 Referenz Indican

Abb.6.3.1.1.a: DC-Fingerprint von Proben des Thüringer Waid, die unter verschiedenen Bedingungen getrocknet wurden



A Behandlung mit 5%iger NaOH

B Behandlung mit 5%iger HCl

Legende:

1 Ernte 06/02, Blätter schockgefroren, lyophilisiert

2 Ernte 06/02, Blätter bei Raumtemp. getrocknet

3 Ernte 06/02, Blätter bei 40°C getrocknet

4 Ernte 08/02, Blätter schockgefroren, lyophilisiert

5 Referenz Isatan A

6 Referenz Isatan B

7 Referenz Indican

Abb.6.3.1.1.b: DC-Fingerprint von Proben des Jenaer Waids, die unter verschiedenen Bedingungen getrocknet wurden

Auch im Jenaer Waid konnten diese neuen Verbindungen gefunden werden (s. DC-Fingerprint, Abb. 6.3.1.1.b).

Der in diesem DC-Vorversuch entdeckte Haupt-Precursor, später als Isatan A bezeichnet, wurde für die Strukturaufklärung aus einem methanolischen Extrakt erntefrischer, eingefrorener Waidblätter des Jenaer Waids (Ernte 08/2001) isoliert. Auf diese Weise konnte auch Isatan B isoliert und dessen wahre Struktur aufgeklärt werden (s. Kap. 6.3.2.).

Isatan A und Isatan B wurden nach erfolgreicher Isolierung und Strukturaufklärung als Referenzsubstanzen für die Gehaltsbestimmung (s. Kap. 6.3.3.) eingesetzt.

Das bei Maugard et al. (2001) beschriebene „Isatan C“, bei dem es sich um ein Dioxindolester handeln soll, konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.

Die Detektion der Indigovorstufen mit 5 %iger HCl oder 5 %iger NaOH basiert auf den Angaben aus der Arbeit von Strobel und Gröger (1989).

6.3.2. Isolierung und Strukturaufklärung von Isatan A und Isatan B

Die Isolierung einer Verbindung ist die Voraussetzung für deren Strukturaufklärung. Die indigobildenden Verbindungen Isatan A und Isatan B wurden dazu aus einem methanolischen Extrakt (s. Kap. 10.3.) von *Isatis tinctoria* gewonnen.

Bis zu diesem Zeitpunkt war Isatan B noch nie in reiner Form isoliert worden und die in der Literatur angegebenen Extraktions- und Isolierungsschritte (Maugard et al. 2001, Kokubun et al. 1997, Stowe et al. 1968) ergaben nur ein Isatan B angereichertes, Indican-freies Gemisch bzw. Rohprodukt. So konnte bis dahin auch keine eindeutige Identifizierung bzw. vollständige Charakterisierung von Isatan B durchgeführt werden und man ging davon aus, dass die von Epstein et al. (1967) postulierte Struktur von Isatan B als *Indoxyl-5-ketogluconat*, seine Richtigkeit hat (Strobel und Gröger 1989, Maugard et al. 2001 u.a.).

Im folgenden ist nun beschrieben, wie die neue, indigobildende Hauptkomponente Isatan A neben der bekannten Indigovorstufe Isatan B isoliert, aufgereinigt und die Strukturen beider Verbindungen mit NMR aufgeklärt wurde. Die aufgereinigten Verbindungen wurden charakterisiert (UV/VIS, IR, Masse, optische Drehung, enzymatische Hydrolyse) und dienten anschließend als Referenzsubstanzen in der quantitativen, densitometrischen Bestimmung des Precursorengehaltes in den gesammelten Waidblattproben (s. Kap. 6.3.3.).

Die Isolierung und Aufreinigung wurde in zwei Schritten mittels Säulenchromatographie erreicht. Zuerst wurde der methanolische *Isatis*-Extrakt (s. Kap. 10.3.) über eine offene Säule an Kieselgel 60 unter Gradientenelution mit Chloroform / Methanol / Wasser – Gemischen in 10 Fraktionen aufgetrennt (s. Kap. 14.2.1.). Anschließend wurden die Isatan-haltigen Fraktionen (Fraktion 3: Isatan B, Fraktion 10: Isatan A) über eine Trennung auf Sephadex[®] LH-20 (2-fach) mit Methanol (s. Kap. 14.2.2.) aufgereinigt.

Trennung auf Kieselgel

Der methanolische Waidextrakt wurde über eine Turbomazeration (s. Kap. 10.3.) gewonnen und anschließend auf Kieselgel („Probenvorbereitung“ s. Kap. 14.2.1.) aufgezogen. Dieses Extrakt-Kieselgel-Gemisch wurde auf die fertige Säule aufgestreut und die Trennung mit Chloroform / Methanol (90:10) gestartet. Während der Trennung wurde die Polarität des Laufmittels erhöht (Gradientenelution). Die Fraktionen wurden durch Dünnschicht-

chromatographie auf den Fortschritt der Trennung überprüft (DC-System 2a/2b, s. Kap. 14.1.) Es konnten so zunächst 35 Fraktionen gesammelt werden, die anschließend zu 10 Fraktionen mit den folgenden Ausbeuten vereinigt wurden:

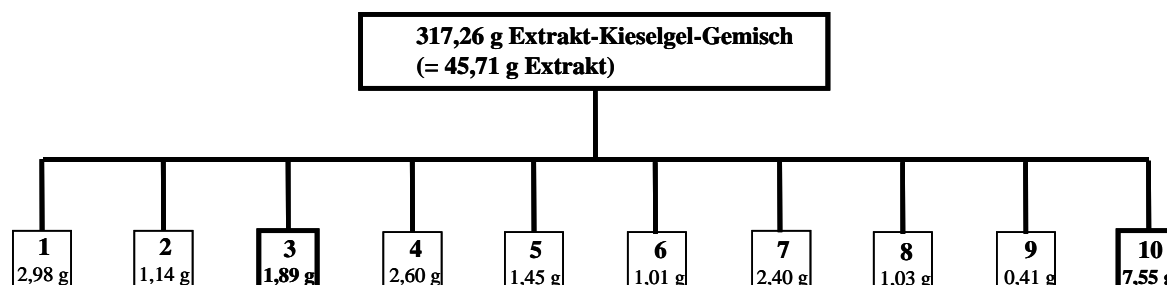


Abb.6.3.2.1.: Ausbeute der Fraktionen bei Kieselgeltrennung

Durch DC-Tests konnte Isatan B in Fraktion 3 und die neue Indigovorstufe, Isatan A, in Fraktion 10 nachgewiesen werden.

Der nächste Aufreinigungsschritt erfolgte über Gelchromatographie auf Sephadex® LH-20.

Aufreinigung über Sephadex® LH-20

A) Isatan A

Ein Aliquot (z.B. 100 mg) von Fraktion 10 wurde in Methanol (4,5 ml) gelöst und über die Injektionsschleife auf die Säule aufgegeben (s. Kap. 14.2.2.). Als Elutionsmittel diente Methanol mit einer Flussrate von 2 ml/min (kleine Säule) resp. 3-4 ml/min (große Säule, s. Kap. 14.2.2.). Die Detektion erfolgte bei 254 nm. Für die Aufreinigungen wurden je nach Menge die kleine Säule (100 mg) oder die große Säule (500-800 mg Fraktion 10) genutzt. Die gesammelten Fraktionen (4 min/Fraktion) wurden zusätzlich mittels DC auf ihren Gehalt an Isatan A überprüft und mit den Chromatogrammen der Trennung verglichen.

Ein Beispiel – Chromatogramm ist in der folgenden Abbildung (Abb. 6.3.2.2.) dargestellt:

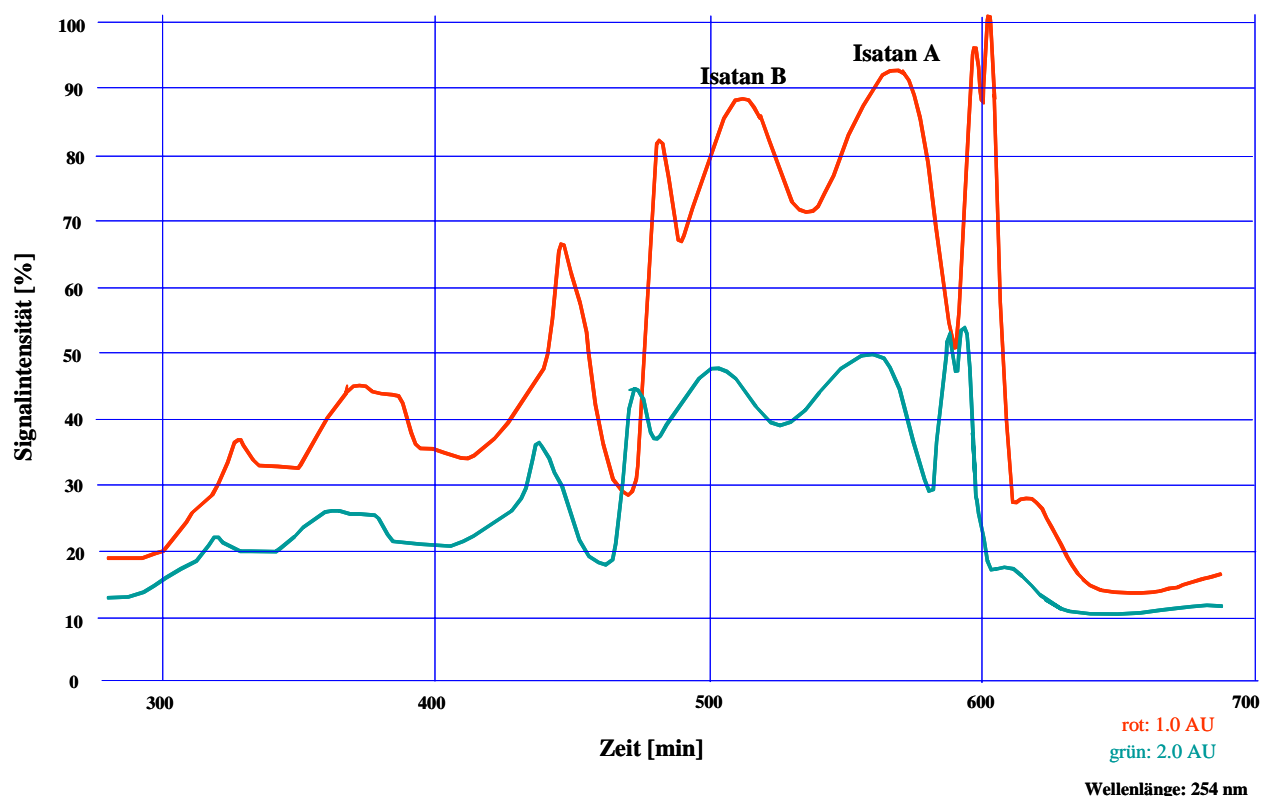


Abb.6.3.2.2.: Beispiel-Chromatogramm einer Sephadex[®] LH-20 Aufreinigung von Fraktion 10 (Isatan A)

Wie aus dem Chromatogramm ersichtlich, enthält Fraktion 10 neben Isatan A noch andere Verbindungen, unter denen Isatan B eine weitere Hauptkomponente darstellt. Isatan B und Isatan A eluieren nacheinander in einem engen Zeitraum (480-580 min) und konnten nicht vollständig voneinander getrennt werden. Außerdem wurden bei den Aufreinigungen stets auch geringe Mengen an Farbpigmenten (Indigo, Indirubin) auf der Säule beobachtet. Die Mengen an gebildeten Pigmenten waren jedoch so gering, dass eine Massebestimmung durch Auswägen nicht möglich war.

Gleichzeitig konnte in den begleitenden DC-Tests festgestellt werden, dass sich Isatan A trotz aller Vorsichtsmaßnahmen (sofortige Entwicklung der DC-Platten sowie schonende, schnelle Weiterverarbeitung der gereinigten Fraktionen, Lagerung der getrockneten Fraktionen bei -32°C unter Argon) immer zu einem bestimmten Anteil in Isatan B und einem geringeren Anteil an Indigo/Indirubin umsetzt. Auch bereits einmal über Sephadex[®] LH-20 aufgereinigtes Isatan A ergab bei einem zweiten Aufreinigungsschritt ein vergleichbares Chromatogramm mit dem Doppelpeak aus Isatan B / Isatan A. Durch diese fortwährende Umsetzung von Isatan A zu Isatan B war eine weitere (dritte) Aufreinigung von Isatan A nicht

sinnvoll. Es zeigte sich vielmehr, dass beide Verbindungen strukturell miteinander verwandt sein müssen. Aus 7,55 g Fraktion 10 wurden ca. 1350 mg Isatan A gewonnen.

A) Isatan B

Auch hier wurden Aliquots (z.B. 500 mg) von Fraktion 3 in Methanol (19,5 ml) gelöst und über die Injektionsschleife auf die große Säule gegeben (s. Kap. 14.2.2.). Die Bedingungen der Säulenchromatographie entsprechen denen der Isatan A – Aufreinigung (s. Kap. 14.2.2.). Die gesammelten Fraktionen (4 min/Fraktion) wurden mittels DC auf ihren Gehalt an Isatan B überprüft, DC – Ergebnisse und Chromatogramm (254 nm) miteinander verglichen und die zusammengehörigen Fraktionen vereinigt. Aus 1,89 g Fraktion 3 wurden so 818 mg Isatan B gewonnen. Ein Beispiel – Chromatogramm ist in der folgenden Abbildung (Abb. 6.3.2.3.) wiedergegeben:

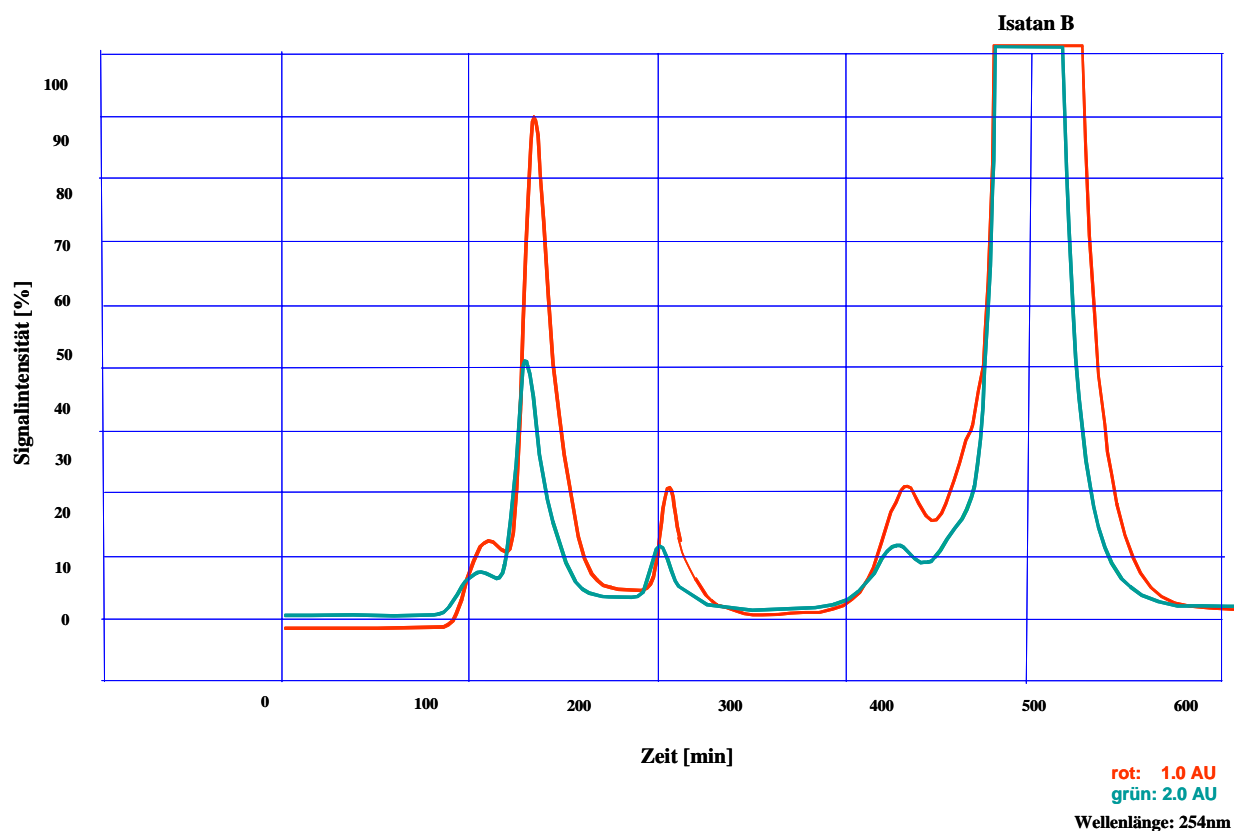


Abb.6.3.2.3.: Beispiel-Chromatogramm einer Sephadex[®] LH-20 Aufreinigung von Fraktion 3
(Isatan B)

Strukturaufklärung mit NMR

Isatan B

Für die vollständige Strukturaufklärung wurden ^1H und ^{13}C sowie ^1H - ^1H -COSY, HMBC und HSQC Spektren an einem Bruker Avance DRX 500 mit Kryo-Probenkopf (s. Kap. 16.5., 19.2.) aufgenommen. Die NMR – Messungen konnten die für Isatan B bisher von Epstein (Epstein et al. 1967) postulierte Struktur als Indoxyl-5-ketogluconat nicht bestätigen.

Die folgende Abbildung (Abb. 6.3.2.4.) wurde aus dem NMR-Datensatz (NMR-Tabelle s. Anhang) zusammengestellt und zeigt, dass Isatan B aus einem Indoxylrest besteht, der in 3-Stellung mit einer 3-Ketohexose (Pyranose) über ein Acetal verknüpft ist.

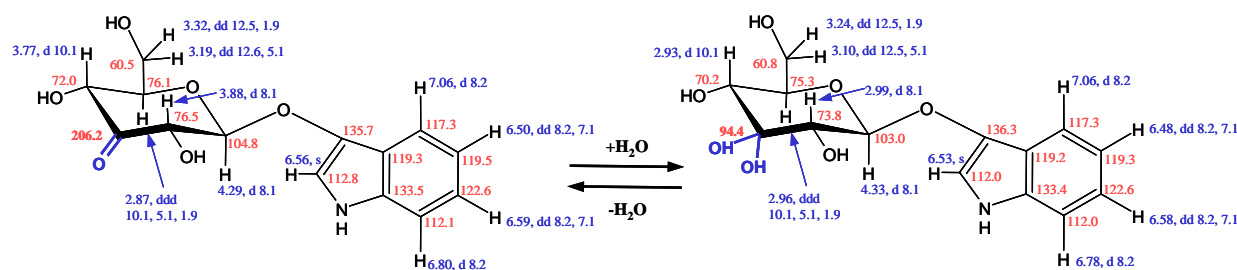


Abb.6.3.2.4.: Isatan B: Indoxyl-O- β -D-ribohexo-3-ulopyranosid

(rot $\delta(\text{C})$, blau $\delta(\text{H})$, J in Hz), gemessen in D_2O

Der Indoxylrest konnte u.a. anhand einer Serie von ^1H - ^1H -COSY und NOE – Signal-Korrelationen zwischen H-C(2) (δ 7,13) \leftrightarrow H-N(1) (δ 10,61) \leftrightarrow H-C(7) (δ 7,29) \leftrightarrow H-C(6) (δ 7,05) \leftrightarrow H-C(5) (δ 6,96) \leftrightarrow H-C(4) (δ 7,55) erkannt werden, d.h. kein Substituent war in diesem Molekülteil vorhanden. Die Resonanzen von H-C(1), H-C(2) und H-C(4) zeigten eine long-range ^1H - ^{13}C Korrelation mit dem Signal bei δ 136,6 (C-3), welches aufgrund des Niedrigfeld-Shifts mit einem Sauerstoff verbunden sein musste und somit die Verbindung zum Zuckeranteil darstellte.

Die bisher angenommene Esterbindung zwischen dem Indoxylrest und dem Zuckerrest konnte jedoch ausgeschlossen werden, da ein charakteristisches Duplet des anomeren Protons in H-C(1'), (δ 4,76) mit deutlicher Korrelation zum C-3 des Indoxylrestes über einen 3-Bindungsabstand zu sehen war. Die Kopplungskonstante ($J_{\text{H-C}(1')\text{-H-C}(2')} = 8 \text{ Hz}$) von H-C(1') zeigte an, dass eine β -Konfiguration am anomeren C-1' (δ 104,8) des Hexosylrestes vorliegt.

Zusätzlich zu C(1') zeigt das HMQC Spektrum eine Methylengruppe (δ_{13C} 60,8, δ_{1H} 3,78/3,61) an, der H₂C-Gruppe in 6'-Stellung zuzuordnen. Daneben waren nur noch 3 weitere Methinkohlenstoffatome zu sehen. Im ¹³C Spektrum konnte schließlich das verbleibende Kohlenstoffatom (C-3') mit einer chemischen Verschiebung von δ 206,0 identifiziert werden, die typisch für eine Carbonylgruppe ist.

Bei dem Hexosylrest handelt es sich also um eine Glucose, die in Position 3 eine Ketogruppe trägt und über Position 1 [C(1')] mit dem C-3 des Indoxylrestes verbunden ist.

In wässriger Lösung entsteht an der Carbonylfunktion ein Hydrat. Dies konnte über eine veränderte chemische Verschiebung im ¹³C Spektrum (δ 94,4) festgestellt werden.

Isatan B ist somit ein Indoxyl-*O*- β -D-ribohexo-3-ulopyranosid (C₁₄H₁₅NO₆). Die Masse der Substanz wurde mit $m/z = 316,07734$ amu ($[M+Na]^+$) bestimmt (kalkuliert: C₁₄H₁₅NaNO₆⁺ $m/z = 316,07994$ amu, HR-ESI-MS, s. Kap. 19.2.).

Isatan A

Die Struktur von Isatan A ist der Struktur von Isatan B sehr ähnlich. Dennoch gibt es einige kleine Unterschiede, die aus dem ¹H-NMR Spektrum erkennbar sind (s. Abb. 6.3.2.5.). So hat Isatan A keine OH-Gruppe an C(6'), denn es fehlt die zugehörige Resonanz (in Isatan B δ 4,90). Außerdem erscheinen die Protonen an C(5') (δ 3,66) und C(6') (δ 4,29) im tieferen Feld als bei Isatan B [C(5') (δ 3,37) und C(6') (δ 3,78 / 3,61)], was auf eine strukturelle Abänderung an C(6') im Vergleich zum Isatan B hindeutet. Weitere, zusätzliche Signale von Methylengruppen im ¹H, ¹³C-NMR und HMQC-Spektrum konnten bei δ_{1H} 3,04 / 3,08 und δ_{13C} 45,6 identifiziert werden. Über das HMBC-Spektrum wurde der *O*-Malonylrest erkannt (δ 168,4 und 168,5), der sich am C(6') befindet.

So konnte die bereits bei den Trennungs- und Aufreinigungsschritten festgestellte Umsetzung von Isatan A zu Isatan B mit den NMR-Daten bestätigt werden. Denn auch bei der Aufnahme der NMR-Daten erfolgte eine Umsetzung des zuvor aufgereinigten Isatan A in Isatan B, so dass auch Signale von Isatan B im Laufe der Messungen verstärkt auftraten (Verhältnis Isatan A zu Isatan B 2:1).

Isatan A ist ein mit Malonsäure (in 6'-Stellung) verestertes Isatan B, also ein Indoxyl-3-*O*-(6'-*O*-malonyl)- β -D-ribohexo-3-ulopyranosid (C₁₇H₁₇NO₉). Die Masse der Substanz wurde mit $m/z = 402,07868$ amu ($[M+Na]^+$) bestimmt (kalkuliert: C₁₇H₁₇NaNO₉⁺ $m/z = 402,08035$ amu,

HR-ESI-MS, s. Kap. 19.2.). Die kompletten NMR-Daten sind tabellarisch im Anhang zusammengefasst.

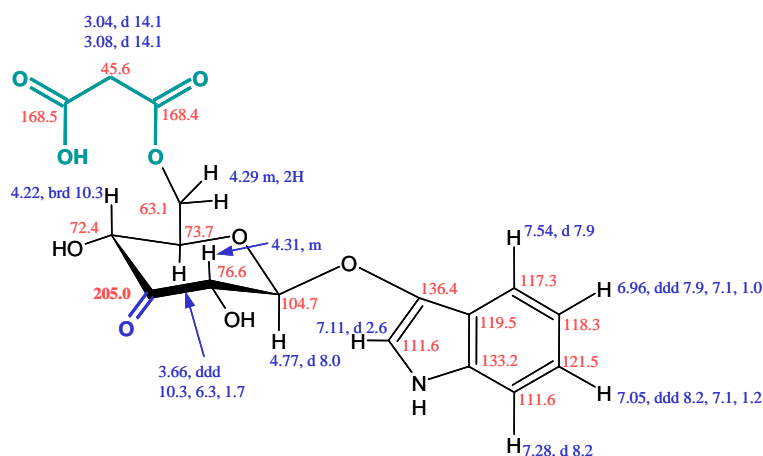


Abb. 6.3.2.5.: Isatan A: Indoxyl-3-O-(6'-O-malonyl)- β -D-ribohexo-3-ulopyranosid

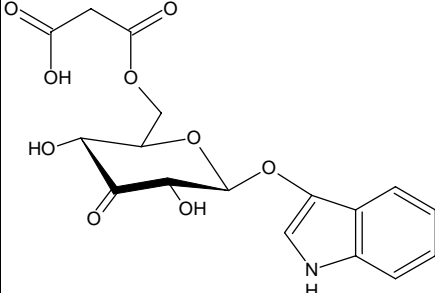
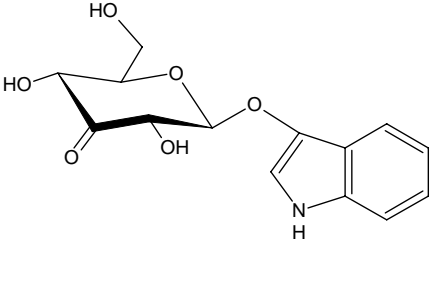
(rot $\delta(C)$, blau $\delta(H)$, J in Hz, gemessen in DMSO- d_6)

Zuordnung des Zuckerrestes zur D- bzw. L-Reihe

Die Zuordnung des Zuckers zur D- bzw. L-Reihe wurde durch eine enzymatische Hydrolyse mit β -D-Glucosidase und β -Glucuronidase überprüft (s. Kap. 18.). Dabei konnten beide Enzyme die O-glykosidische Bindung zwischen dem Indoxylrest und der Ribohexo-3-ulopyranose im Isatan B resp. der Glucose im Indican, spalten. Das entstandene Indigo sammelte sich durch Ausschütteln mit BuOH an der Phasengrenze an und konnte visuell im Vergleich zum Blank ausgewertet werden. Isatan A konnte enzymatisch nicht hydrolysiert werden. Möglich ist, dass der Malonylrest die enzymatische Umsetzung sterisch behindert. Aufgrund der Umsetzung mit der β -D-Glucosidase ist davon auszugehen, dass die Zucker der D-Reihe angehören.

Charakterisierung von Isatan A und Isatan B

In der folgenden Tabelle (Tab. 6.3.2.1.) sind die physikochemischen Eigenschaften der beiden Verbindungen zusammengefasst:

Eigenschaft	Isatan A	Isatan B
Aussehen	beige, amorphes Pulver, hygroskopisch	weiß-beige, amorphes Pulver
Optische Drehung (1 mg/ml, MeOH)	$[\alpha_m]^{20}_D = -10,47$	$[\alpha_m]^{20}_D = -13,96$
UV/VIS (200-800 nm) λ_{\max} [nm] und ($\epsilon \cdot 10^4$)	221 (25,03), 251 (3,51), 280 (4,61) (c = 0,01 mg/ml, MeOH)	223 (3,22), 281 (0,57) (c = 0,005 mg/ml, MeOH).
IR (KBr)	3420, 1734, 1672, 1376, 1197, 1048, 826, 795, 740, 721 cm^{-1}	3407, 2919, 2876, 1728, 1616, 1555, 1450, 1345, 1302, 1227, 1055, 746, 419 cm^{-1}
ESI-MS (pos.)	401,8 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 420,2 ($[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$), 132,1 ($[\text{M}-247.2+\text{H}]^+$)	316,1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 294,2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 311,2 ($[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$), 132,1 ($[\text{M}-161.1+\text{H}]^+$)
ESI-MS (neg.)	378,2 ($[\text{M}-\text{H}]^-$), 292,1 ($[\text{M}-87.1-\text{H}]^-$)	292,2 ($[\text{M}-\text{H}]^-$)
HR-ESI-MS	m/z = 402,07868 amu ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) kalkuliert: $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NaNO}_9^+$ m/z = 402,08035 amu	m/z = 316,07734 amu ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) kalkuliert: $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NaNO}_6^+$ m/z = 316,07994 amu
Summenformel	$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_9$	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_6$
Struktur		

Tab. 6.3.2.1.: Physikochemische Eigenschaften von Isatan A und Isatan B

6.3.3. Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung von Isatan A, Isatan B und Indican

Schon durch die DC-Versuche (s. Kap. 6.3.1.) ergaben sich die ersten Hinweise zur Instabilität der Indoxylderivate Isatan A und Isatan B. So konnte man hier bereits erkennen, dass der Gehalt in sehr starkem Ausmaß von den Trocknungsbedingungen, weniger jedoch vom Erntezeitpunkt beeinflusst wird.

Für die Quantifizierung der Indoxylderivate wurden die Proben, die 2002 geerntet wurden, verwendet. Die Trocknung der Proben ist in Kap. 6.1. und Kap. 9. (Materialien und Methoden) beschrieben.

Die Extraktion (s. Kap. 10.1.) und Analyse der Proben (s. Kap. 17.1.) wurde ein Jahr später (2003) ausgeführt. Zum Zeitpunkt der Ernte war die Existenz der instabilen Vorstufen noch nicht bekannt. Die Lagerung der Proben hätte nach diesen neuen Erkenntnissen schonender (tiefgekühlt) und die Analyse unmittelbar nach den Ernten (nur kurze Lagerzeiten) erfolgen müssen. Daher ist nicht auszuschließen, dass die hier bestimmten Gehaltsangaben niedriger liegen. Dennoch konnte mit der Quantifizierung von Isatan A/B und Indican gezeigt werden, dass der Trocknungsprozess den Abbau beschleunigt oder den Gehalt steigert (Indican).

Methodenentwicklung / Problemstellung

Ursprünglich sollte eine HPLC-Methode mit DAD-Detektion für die Quantifizierung der Indoxylderivate in Extrakten entwickelt werden. In der Literatur gibt es dazu nur vier Arbeiten, die sich mit der HPLC-basierten Gehaltsbestimmung von Indigoprecursoren beschäftigen. In zwei Arbeiten wird der Gehalt von Indican in *Polygonum tinctorium* bestimmt. Als Detektoren für die HPLC werden in diesen Arbeiten entweder der ELSD-Detektor (Evaporative Light Scattering Detektor) durch Angelini et al. (2003) oder der DAD-Detektor durch Maugard et al. (2002) nach Trennung auf einer RP-18 Phase mit wässrigen Laufmitteln (Wasser / Acetonitril oder Wasser / MeOH) genutzt.

Die methodischen Grundzüge der anderen beiden Arbeiten, die sich mit der qualitativen Bestimmung von Isatan B (Gilbert et al. 2000) und mit der quantitativen Bestimmung aller

Indigoprecursoren (Maugard et al. 2001) in *Isatis tinctoria* beschäftigen, sind nach den heutigen Kenntnissen in der genannten Form nicht nachvollziehbar.

Beide Arbeitsgruppen nutzen so für die Erfassung der Precursoren in der Extraktmatrix RP-18 Phasen und wässrige Laufmittelsysteme (isokratisch oder Gradient) mit Säurezusatz und detektieren mit DAD bei 280 nm (Maugard et al. 2001) oder ELSD (Gilbert et al. 2000). Die drastischen HPLC-Bedingungen, die bei Maugard et al. (2001) zur Anwendung kommen (TFA-Zusatz, erhöhte Säulenofentemperatur von 50°C) dürfte die instabilen Vorstufen (Isatan A/B) in der Analyse zerstören. Die in der Arbeit von Gilbert et al. (2000) bestimmte Masse für Isatan B (Kopplung von HPLC-ELSD mit APCI-MS) mit 309 amu ist die der alten Struktur (Indoxyl-5-ketogluconat) von Epstein et al. (1967). Die Masse von Isatan B ist 293,2 amu (s. Kap. 6.3.2.).

Die Nutzung der RP-Phase mit vorwiegend wässrigen Laufmittelgemischen ist aufgrund der Strukturen von Isatan A/B nicht möglich. Im wässrigen Milieu setzt an der Carbonylgruppe (C-3') der Glucose (s. Kap. 6.3.2., S. 61, 63) die Bildung eines Hydrates (Gleichgewicht zwischen Keto- und Hydratform) ein. Dadurch ändern sich die Adsorptionseigenschaften zwischen Isatan A bzw. Isatan B und der RP-Phase. Damit verbunden sind höchst unsymmetrische, unscharfe Peaks. Daher kam nur die Entwicklung einer HPLC-Methode auf Normalphase unter Verwendung nichtwässriger Laufmittelsysteme in Betracht. Aber auch die Verwendung der Normalphase (Cyano-, Diol- oder Aminophasen) in Verbindung zur Detektion über DAD gestaltete sich schwierig, da die zu quantifizierenden Precursoren mit den Absorptionsmaxima von 220 und 280 nm nur eine begrenzte Anzahl von möglichen organischen Laufmitteln zuließ. Für Isatan B und Indican konnten optimale Bedingungen (Phase: Diol, LM: Hexan / MeOH / Isopropanol) zur Trennung auf der HPLC gefunden werden. Für Isatan A war die Trennung auf HPLC nicht optimierbar. Einerseits eluierte Isatan A nie als symmetrischer, zeitlich eng begrenzter Peak, sondern kam über mehrere Minuten als breiter flacher „Peak“ von der Säule. Andererseits änderte diese Verbindung das Retentionsverhalten in Abhängigkeit von der injizierten Konzentration, d.h. es wurden Verschiebungen der Retentionszeit von über 5 min beobachtet.

Die für das Indican und Isatan B optimierten HPLC-Bedingungen waren wiederum nicht auf die Quantifizierung in der Extraktmatrix übertragbar. Andere Extraktverbindungen mit ähnlicher Retentionszeit und Absorptionsmaxima (Flavonoide), die ebenfalls in großer Menge

im Extrakt vorhanden waren, störten die Erfassung der Precursoren über den DAD-Detektor. Vielleicht wäre an dieser Stelle die Nutzung eines ELSD-Detektors besser geeignet.

Dies erklärt, warum in anderen Arbeitsgruppen die Erfassung der Precursoren vorwiegend über spektroskopische Methoden nach Kopplung mit Thymol (Strobel und Gröger 1989) oder Rhodanin (Kokobun et al. 1998) erfolgte.

Aufgrund der aufgeführten Probleme wurde schließlich eine DC-Methode mit densitometrischer Auswertung entwickelt. Dazu wurde DC-System 3 (s. Kap. 14.1.) unter Einsatz von HPTLC-Platten genutzt und die durch die HCl bzw. NaOH – Tauchbehandlung entstandenen Pigmente vermessen.

Methodenvalidierung

Spezifität / Selektivität

Bei der Spezifität einer Analysenmethode wird gezeigt, dass der zu untersuchende Analyt ohne Beeinflussung der in der Probe vorhandenen, weiteren Komponenten bzw. der Matrix erfasst werden kann. Dies wird bei dieser Methode durch die Auftrennung der Extraktkomponenten auf den HPTLC-Platten gewährleistet, denn alle drei Precursoren besitzen auf diesen Platten unter den definierten Elutionsbedingungen (s. Kap. 14.1., DC-System 3) charakteristische R_f – Werte (Isatan A: $R_f = 0,44$, Isatan B: $R_f = 0,96$, Indican: $R_f = 0,85$). Außerdem ist die Farbentstehung je nach Behandlung mit HCl oder NaOH unterschiedlich. Indican kann so nur durch die Säureanwendung Farbpigmente bilden und wird durch die Einwirkung der Base nicht umgesetzt. Dagegen reagieren Isatan A/B sowohl nach Behandlung mit NaOH zu einem tiefblauen Pigment als auch nach HCl-Behandlung zu einem grau-blauen Pigment. So lassen sich Isatan A und B eindeutig als Indigoblau erfassen während Indican nur nach HCl-Detektion densitometrisch vermessen werden kann. Da auch im R_f -Bereich des Isatan A noch weitere, bisher unbekannte Vorstufen (nur) mit Säure zu Farben reagieren (s. Kap. 6.3.1.), wurde Isatan A nach Umsetzung mit NaOH densitometrisch quantifiziert, da es als einzige Substanz in diesem R_f -Bereich (0,25-0,33) mit NaOH reagierte. Für die densitometrische Auswertung des Indican-, Isatan A/B-Gehaltes wurden zunächst Remissionspektren im Bereich von 200-700 nm, sowohl für die aus Indican nach HCl-Detektion als auch für die aus Isatan A/B nach NaOH-Detektion gebildeten Farbpigmente

aufgenommen. Das aus Indican gebildete Pigment (grau-blau) besitzt folgende Absorptionsmaxima im Remissionspektrum: 232, 281, 380-420 nm (Plateau) und 590-650 nm (Plateau). Das aus Isatan A und B jeweils gebildete tiefblaue Pigment absorbierte bei 340 und 660 nm.

Die Messungen zur Aufnahme der Kalibrierkurven und Quantifizierung der Vorstufen in den Extrakten wurden bei 380 nm für die Indican und 605 nm für die Isatan A/B ausgeführt. Die Zuordnung der Peakflächen (Intensität der Remission) der untersuchten Indigovorstufen erfolgte stets unter Berücksichtigung der für jede Vorstufe typischen R_f – Wertes.

In der folgenden Grafik sind die densitometrischen Spuren für Isatan A/B (s. Abb. 6.3.3.1.a) und Indican (s. Abb. 6.3.3.1.b) als Beispiel dargestellt. Dafür wurden Extrakte aus gefriergetrockneten Blättern des Thüringer Waids (August 2002) verwendet.

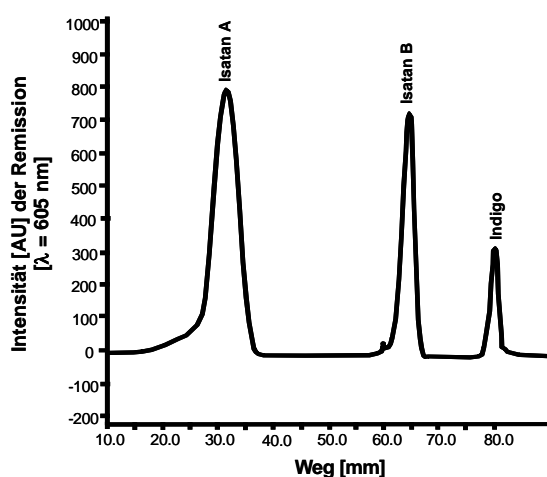


Abb. 6.3.3.1.a: Chromatogramm (Bsp.) für die Erfassung von Isatan A/B nach NaOH-Umsetzung (gefriergetr. Probe des Thüringer Waids)

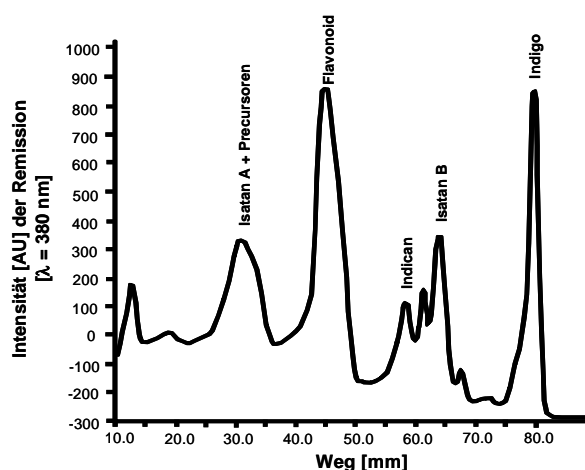


Abb. 6.3.3.1.b: Chromatogramm (Bsp.) für die Erfassung von Indican nach HCl-Umsetzung (gefriergetr. Probe des Thüringer Waids)

Die densitometrische Spur von Isatan A/B (gefriergetrocknete Proben) nach basischer Umsetzung lässt eine eindeutige Flächenbestimmung jeder Komponente zu (s. Abb. 6.3.3.1.a). Dagegen entsteht in den gefriergetrockneten Proben durch Säurebehandlung ein viel komplexeres Farbmuster, da nicht nur Indican sondern auch vorhandenes Isatan A/B durch die Säure umgesetzt werden (s. Abb. 6.3.3.1.b). Aufgrund ähnlicher R_f -Werte liegen Indican und Isatan B benachbart. Die Fläche des Indicans wird hier durch Fällung des Lots bestimmt. In den Proben, die bei Raumtemperatur bzw. 40°C getrocknet wurden, gibt es kein Isatan A/B mehr, hier ist die Indicanbestimmung einfacher.

Wiederholbarkeit

Um die Wiederholbarkeit dieser Methode zu überprüfen, wurden Kalibrierkurven für Isatan A, Isatan B und Indican an zwei verschiedenen Arbeitstagen (zeitlicher Abstand 3 Wochen) aufgenommen. Die Kalibrierlösungen wurden dafür jeweils frisch hergestellt. Gleiche Precursor-Konzentrationen wurden 3-fach auf DC aufgetragen und bestimmt. Die relativen Standardabweichungen der Kalibrierpunkte lagen je nach Konzentration zwischen 0,2-18,4 % (Indican), 1,3-19,3 % (Isatan B) und 4,2-29,9 % (Isatan A). Die Vermessung geringer Konzentrationen ist mit einer größeren relativen Standardabweichung behaftet (Isatan A [5 µg] 26,3 %, Isatan B [0,25 µg] 27,0 %, Indican [0,25 µg] 18,4 %) Alle drei Kalibrierkurven ergaben Funktionen 2. Ordnung (s. Abb. 6.3.3.2.).

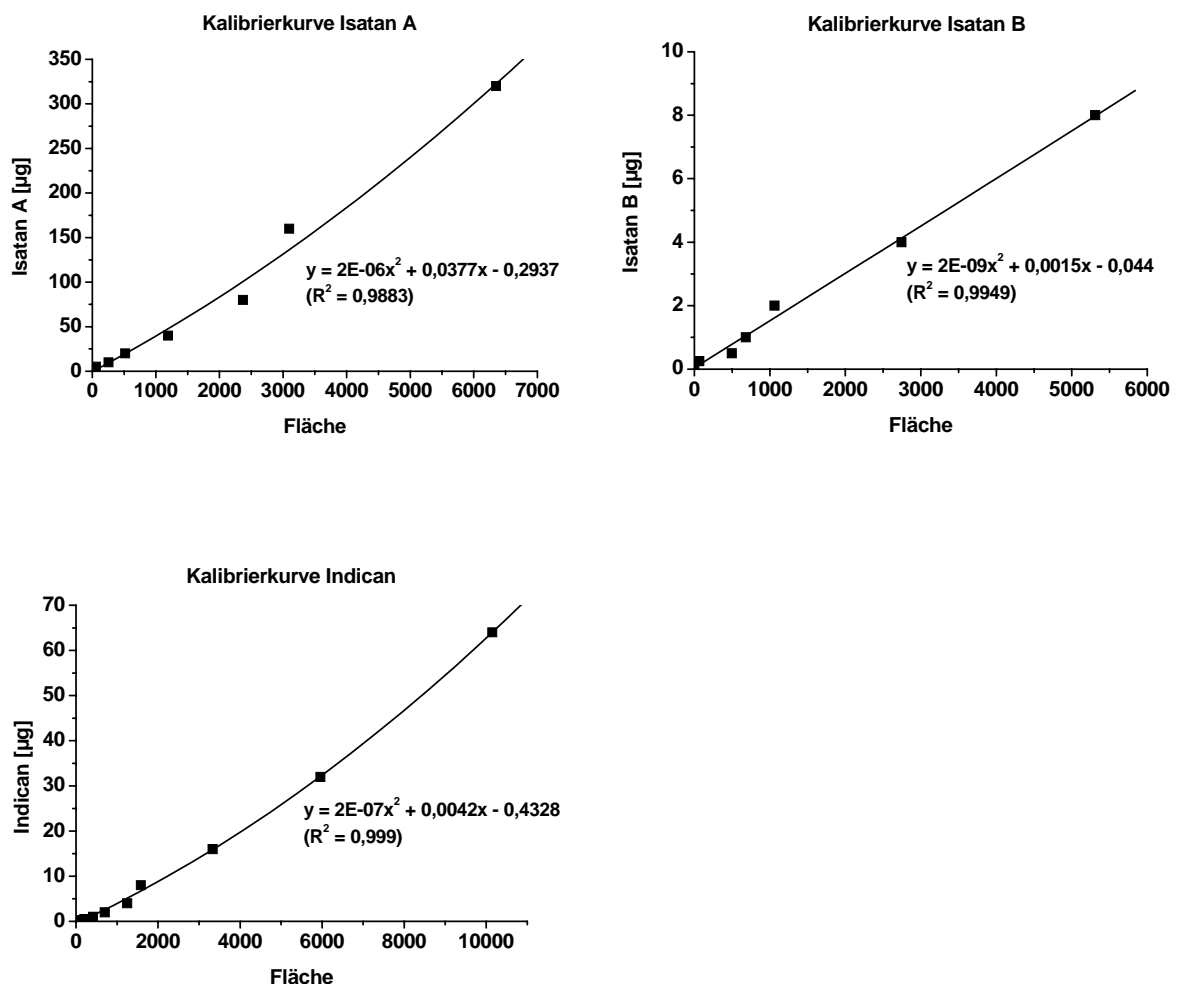


Abb. 6.3.3.2.: Kalibrierkurven der Precursoren

Arbeitsbereich, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Robustheit der Methode

Arbeitsbereich: Für Isatan A wurden die Kalibrierkurven für den Bereich 2,5-320 µg bestimmt, die Isatan A Werte, die in den Extrakten ermittelt wurden, lagen im Bereich von 10-80 µg Isatan A. Für Isatan B wurden Kalibrierkurven im Bereich 0,25-8 µg Isatan B aufgenommen, die Extraktwerte lagen zwischen 0,16-2 µg Isatan B. Für Indican wurden die Kalibrierkurven von 0,25-64 µg Indican erfasst, die Extraktwerte bewegten sich zwischen 3-30 µg Indican.

Nachweisgrenze (LOD): Für Indican und Isatan B wurde diese mit ca. 0,25 µg und für Isatan A mit ca. 5 µg bestimmt.

Bestimmungsgrenze (LOQ): Diese liegt für Indican und Isatan B bei ca. 0,5 µg und für Isatan A bei ca. 10 µg.

Ein Teil der Isatan B Werte der Extrakte liegt zwischen Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Nur zwei Werte liegen oberhalb der Bestimmungsgrenze. Unterhalb der Bestimmungsgrenze ist eine genaue Quantifizierung eigentlich nicht mehr möglich und der Einfluss des Messfehlers größer. Alle anderen Extraktwerte, Indican und Isatan A betreffend, lagen oberhalb ihrer Bestimmungsgrenzen.

Robustheit: Die Robustheit der Methode wurde durch die Aufnahme der Kalibrierkurven an zwei verschiedenen Arbeitstagen kontrolliert. Diese waren vergleichbar (s. Tab. 6.3.3.1.):

Verbindung	Kalibrierkurve I	Kalibrierkurve II
Isatan A	$y = 2 \cdot 10^{-6}x^2 + 0,0377x - 0,2937$ ($R^2 = 0,9883$)	$y = 1 \cdot 10^{-6}x^2 + 0,0444x + 0,733$ ($R^2 = 0,9954$)
Isatan B	$y = 2 \cdot 10^{-9}x^2 + 0,0015x + 0,044$ ($R^2 = 0,9949$)	$y = -6 \cdot 10^{-9}x^2 + 0,0015x + 0,0441$ ($R^2 = 0,9999$)
Indican	$y = 2 \cdot 10^{-7}x^2 + 0,0042x - 0,4328$ ($R^2 = 0,9990$)	$y = 5 \cdot 10^{-7}x^2 + 0,0028x - 0,0036$ ($R^2 = 0,9969$)

Tab. 6.3.3.1.: Kalibrierkurven zweier verschiedener Arbeitstage

Außerdem wurde die Stabilität der gebildeten Farben geprüft. Dazu wurden die für die Kalibrierkurven genutzten Platten mit den ansteigenden Precursor-Konzentrationen einmal direkt nach der Plattenentwicklung sowie 24 h später vermessen.

Die Farbintensität der gebildeten Pigmente verringert sich nach 24 h. Dies ist für jede Indigovorstufe unterschiedlich und auch konzentrationsabhängig. Setzt man die Farbintensität

der direkten Vermessung der Einzelpunkte 100 % (Zeitpunkt „0“), so nimmt die Farbintensität bei Isatan A in höheren Konzentrationsbereichen (40-320 µg) geringer ab (0,6-17,8 %) als im unteren Konzentrationsbereich (5-20 µg, Abnahme 12,9-38,6 %). Dieser Trend ist auch bei Isatan B zu sehen (Bereich: 0,25-1 µg, Abnahme um 29,4-64,4 % und im Bereich 2-8 µg Abnahme um 13,9-29,9 %). Beim Indican konnte diese Konzentrationsabhängigkeit nicht beobachtet werden, hier nimmt die Farbintensität um 7,5-31,3 % ab. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die Indigoprecursoren in den Extrakten stets direkt nach der Entwicklung der HPTLC-Platten vermessen.

Haltbarkeit: Aufgrund der Instabilität von Isatan A sollten Lösungen mit dieser Verbindung nicht über längere Zeit bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Günstig ist die tiefgekühlte Aufbewahrung der Standardlösungen. Isatan B und Indican sind weniger problematisch, sie können über längere Zeit genutzt werden, sollten aber auch kühl gelagert werden (2-8°C).

Fehlerquellen: Die densitometrische Gehaltsbestimmung der Indigo-Precursoren in Extrakten nach HPTLC-Auftrennung ist im Moment eine Alternative zur bisher noch problembehafteten Bestimmung per HPLC. Die Kopplung aus dünnschichtchromatografischer Auftrennung und densitometrischer Vermessung ist jedoch störanfälliger. Daher ist zur Minimierung der Fehlerquellen einiges zu beachten. Wichtig ist zum einen die Kalibrierung der Methode durch regelmäßige Aufnahme von Kalibrierkurven, zum anderen ist die Mitführung von definierten Referenzmengen auf jeder HPTLC-Platte eine gute Möglichkeit, diese Kalibrierung stetig zu überprüfen. Aufgrund der Farbintensitätsverlustes nach 24 h ist die unmittelbare densitometrische Auswertung nach Plattenentwicklung zu empfehlen. Da Isatan A eine sehr instabile Verbindung ist, sollten die Haltbarkeitshinweise unbedingt eingehalten werden. Des weiteren ist eine gleichmäßige Auftragung der Testlösungen, z.B. mit einem Auftragegerät (s. Kap. 19.1.), wichtig.

Trotz der Einschränkungen, die diese Methode aufgrund ihres Messprinzipes beinhaltet und die durch Beachtung der genannten Fehlerquellen minimiert werden können, ist diese Methode eine attraktive Alternative zur schnellen und relativ einfachen Erfassung der Indigovorstufen ohne größeren gerätetechnischen Aufwand. Damit könnte die Qualität der angebauten Waidpflanzen hinsichtlich des Gehaltes der Farbvorstufen routinemäßig kontrolliert werden.

6.4. Untersuchung der Extrakte auf den Gehalt an Indigoprecursoren in Abhängigkeit von Erntezeitpunkt und Nacherntebehandlung

Mittels Densitometrie konnte der Gehalt an Isatan A, Isatan B und Indican in den Blattproben ermittelt werden. Alle Gehalte wurden durch Dreifachbestimmung ermittelt und auf die getrocknete Probe berechnet. Während Isatan A und B nur in den gefriergetrockneten Blattproben nachweisbar waren, konnte ein Anstieg des Indicangehaltes durch die Erhöhung der Trocknungstemperatur festgestellt werden.

6.4.1. Gehalt an Isatan A und Isatan B

Der Gehalt von Isatan A und Isatan B konnte nur in den gefriergetrockneten Proben bestimmt werden. Die bei Raumtemperatur oder 40°C getrockneten Proben enthielten diese Verbindungen nicht mehr (s. DC Kap. 6.3.1.). Wie aus der Grafik (s. Abb. 6.4.1.1.a) ersichtlich, ist der Gehalt an Isatan A in den fünf untersuchten Herkünften unterschiedlich, die höchsten Mengen an Isatan A wurden mit 9,5 und 9,9 % im Thüringer Waid (TW) und mit 8,1 bzw. 6,8 % im Jenaer Waid (JW) gefunden. Auch der Französische Waid (FW, August mit 8,5 %) und der Schweizer Waid (SW, Juni mit 10,2 %) enthielten vergleichbare Mengen an Isatan A (alle Werte s. Anhang). Den geringsten Gehalt an Isatan A enthielt der Kieler Waid (KW, 0,3 bzw. 2,6 %). Eine Abhängigkeit des Isatan A Gehaltes vom Erntezeitpunkt konnte anhand dieser zwei Schnitte (Juni, August) nicht festgestellt werden.

Der Gehalt an Isatan B ist sehr viel geringer als der von Isatan A (s. Abb. 6.4.1.1.b). Je nach Herkunft und Erntezeitpunkt wurden unterschiedliche Mengen an Isatan B ermittelt. Auch hier konnte kein allgemeiner Trend zwischen Gehalt und Erntezeitpunkt festgestellt werden. Die höchsten Gehalte an Isatan B erreichen dabei Werte um die 0,22 % (JW, August) und 0,27 % (FW, Juni). Bei den meisten Proben liegen die Werte jedoch zwischen 0,01-0,1 %. Geringe Gehalte an Isatan B sind wieder im Kieler Waid (KW) nachgewiesen worden.

Beim Thüringer, Jenaer und Schweizer Waid (Juni 2002) sowie beim Französischen und Schweizer Waid (August 2002) konnte ein Verhältnis von Isatan A zu Isatan B mit ca. 250:1 festgestellt werden.

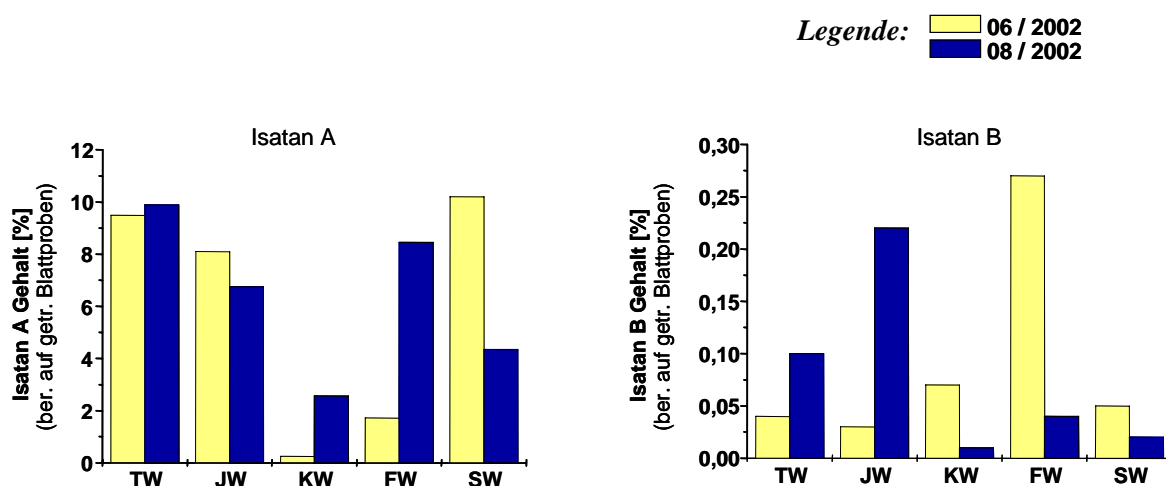


Abb. 6.4.1.1.a: Gehalt an Isatan A in den Proben

Abb. 6.4.1.1.b: Gehalt an Isatan B in den Proben

6.4.2. Gehalt an Indican

Indican konnte in allen Proben der Ernten Juni und August 2002 nachgewiesen werden (alle Werte s. Anhang). Wie aus der Grafik (s. Abb. 6.4.2.1.) ersichtlich, nimmt der Indicangehalt mit Erhöhung der Trocknungstemperatur nach der Ernte zu, d.h. der geringste Gehalt an Indican ist jeweils in den gefriergetrockneten Blattproben zu finden. Dieser Trend war bereits visuell auf den entwickelten HPTLC-Platten sichtbar. Der Gehalt, der in den Proben im Juni mit 0,4-0,7 % bestimmt wurde, liegt geringfügig niedriger als in den Blattproben, die im August geerntet wurden (0,5-0,8 %). Bei Trocknung der Proben bei Raumtemperatur (ca. 23°C) erhöht sich der Indicangehalt um das 3 bis 4-fache auf 1,5-2,4 % (Juni) bzw. 1,4-3,2 % (August).

Wählt man eine noch höhere Trocknungstemperatur (40°C), dann steigt der Gehalt dieser Verbindung noch weiter an und erreicht das 4 bis 6-fache der gefriergetrockneten Proben.

Indican scheint im Gegensatz zu Isatan A/B ein recht stabiles Indoxylderivat zu sein. Die Ursache für den Anstieg des Gehaltes bei der Trocknung liegt vermutlich in der fehlenden Umsetzung von Indican in Isatan B begründet. Falls es sich bei den noch nicht identifizierten Precursoren der unteren polaren Zone (s. Kap. 6.3.1.) um Acylderivate des Indicans handeln sollte, so ist auch ein Abbau dieser Derivate in Indican bei der Trocknung denkbar.

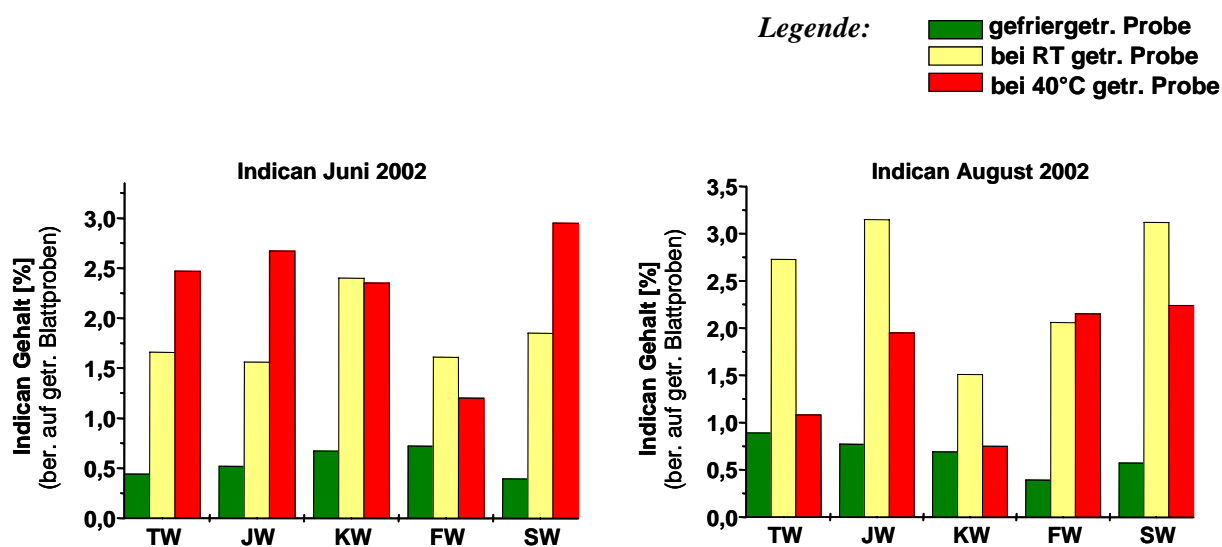


Abb. 6.4.2.1.: Gehalt an Indican in den bei verschiedenen Temperaturen getrockneten Proben im Juni und August 2002

6.5. Zusammenfassung

Durch Vorversuche auf DC-Platten (s. Kap. 6.3.1.) wurden in gefriergetrockneten Waidblättern neue, indigobildende Verbindungen mit höherer Polarität als Isatan B oder Indican entdeckt. Einige dieser Verbindungen verhielten sich bei Einwirkung der Säure (5 % HCl) wie Indican und waren auch nur durch Säurebehandlung sichtbar zu machen. Der neue Indigo-Precursor, das Isatan A, wurde entdeckt, weil es sich beim Besprühen mit NaOH, HCl oder Ehrlichs Reagenz wie Isatan B verhielt, aber deutlich polarer war.

Um die Strukturaufklärung durchführen zu können, wurde Isatan A aus einem methanolischen Waidextrakt frischer Blätter isoliert. Daneben wurde auch Isatan B erstmalig in reiner Form gewonnen (s. Kap. 6.3.2.). Die für Isatan B bisher postulierte Struktur (Epstein et al. 1967) wurde korrigiert. Daneben konnte Isatan A als Malonylderivat des Isatan B identifiziert werden. Für beide Verbindungen konnte abschließend eine vollständige Charakterisierung durchgeführt werden.

Neben Indican (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) konnten die isolierten Verbindungen (Isatan A/B) nun als Referenzen für die Untersuchung der saisonal und prozessbedingten

Veränderungen des Gehalts der Indigo-Precursoren (s. Kap. 6.3.3.) unter Nutzung der Densitometrie als Messmethode eingesetzt werden.

Vergleich der Gehalte mit Literaturangaben

Leider werden die Gehaltsangaben der Indigo-Precursoren in der Literatur sehr unterschiedlich angegeben. Einige Arbeiten berechnen so die Gehalte entweder auf $\mu\text{mol/g}$ Frischmasse (Maugard et al. 2001) bzw. mg/g Frischmasse oder in % bezogen auf Trocken- oder Frischmasse (Kokobun et al. 1998).

Maugard et al. (2001) gibt an, für die Precursoren Werte zwischen 3-25 $\mu\text{mol/g}$ Frischmasse bestimmt zu haben. Am Beispiel des Thüringer Waids (06/2002) soll dies berechnet werden:

	Precursor (s. Tab. im Anhang)	Precursor (in Trockenmasse)	Precursor (in Frischmasse) (1g TM = 9,5 g FM)
Isatan A (Mr = 379,2 g/mol)	94,85 mg/g TM	250 $\mu\text{mol/g}$ TM	26 $\mu\text{mol/g}$ FM
Isatan B (Mr = 293,2 g/mol)	0,42 mg/g TM	1,4 $\mu\text{mol/g}$ TM	0,15 $\mu\text{mol/g}$ FM
Indican (Mr = 295,3 g/mol)	4,40 mg/g TM $\Sigma=99,67 \mu\text{mol/g TM}$	15 $\mu\text{mol/g}$ TM $\Sigma=266,4 \mu\text{mol/g TM}$	1,6 $\mu\text{mol/g}$ FM $\Sigma=27,7 \mu\text{mol/g FM}$

Tab. 6.5.1.: Beispiel-Rechnung (Thüringer Waid)

Für den Kieler Waid, der die geringsten Gehalte an Isatan A/B aufwies, errechnet sich auf diese Weise eine Summe von ca. 3,8 μmol Precursoren /g Frischmasse (1g TM = 8,3 g FM). Beide Beispiel-Werte würden in dem von Maugard et al. (2001) angegebenen Bereich liegen. Die Lagerung der gefriergetrockneten Blattproben bei Raumtemperatur über ein Jahr (Ernte 06/2002, Extraktionen 09/2003) führte, nach den heutigen Erkenntnissen zur Instabilität der Vorstufen, sicherlich zu einem weiteren Abbau von Isatan A/B. Somit liegen die hier bestimmten Gehalte niedriger. Dies wird in einer weiteren Quantifizierungsserie mit gefriergetrockneten Proben aus 2003, die tiefgekühlt lagern, zur Zeit überprüft. Erste Ergebnisse deuten auf weitaus höhere Gehalte hin. Damit könnte der bei Kokobun et al. (1998) angegebene Gehaltsbereich von 14-24 % Indoxylderivate (berechnet auf die Trockenmasse) erreicht werden.

7. Diskussion

Die ersten Aspekte dieser Arbeit, die Untersuchung der Hautpenetration von Tryptanthrin (s. Kap.3.) und die Identifizierung der α -Linolensäure (s. Kap. 4.) waren pharmakologisch orientiert und sollten die bisher zur anti-inflammatorischen Aktivität des Waidextraktes und Tryptanthrin erhaltenen Erkenntnisse ergänzen (s. Kap. 5.).

Da Tryptanthrin als Inhibitor der Enzyme COX-2 und 5-LOX identifiziert worden war (Danz et al. 2001), galt auch das Interesse dem Gehalt dieser Verbindung in Extrakten des Waid.

Über Gehaltsbestimmungen in den Blattproben verschiedener Waidherkünfte, die nach der Ernte unterschiedlichen Trocknungsbedingungen zugeführt wurden, sollte Hinweise zum nativen Vorkommen oder zur Bildung von Tryptanthrin gefunden werden.

Zunächst unabhängig davon wurde in einem DC-Screening das Isatan A als Haupt-Indigovorstufe neben Isatan B (Minorkomponente) in gefriergetrockneten Blattproben entdeckt (s. Kap. 6.3.1.). Daraufhin gelang die Isolierung dieser neuen Verbindung und auch Isatan B konnte erstmalig rein gewonnen werden. Durch die anschließende Strukturaufklärung von Isatan B und Isatan A mit NMR konnte die seit fast 40 Jahren bestehende Auffassung über die Struktur des Isatan B als Indigovorstufe in *Isatis tinctoria* L. korrigiert werden. Denn es stellte sich heraus, dass Isatan B ein Indoxyl-O- β -D-ribohexo-3-ulopyranosid ist (s. Kap. 6.3.2.), und nicht wie bisher angenommen, ein Indoxyl-5-ketogluconat (Epstein et al. 1967). Isatan A enthält als Indoxyl-3-O-(6'-O-malonyl)- β -D-ribohexo-3-ulopyranosid im Gegensatz zu Isatan B zusätzlich ein Malonylrest am C-6' des Zuckerrestes. Durch diese neuen Erkenntnisse konnte nun endlich die fehlende biogenetische Beziehung und strukturelle Verwandtschaft zwischen den Indoxylderivaten Indican, Isatan B und Isatan A hergestellt werden (s. Kap. 7.1. und Abb. 7.1.1.).

Da bereits in den Vorversuchen Isatan A/B nur in gefriergetrockneten Blattproben nachgewiesen werden konnte, ergab sich die Frage, inwiefern die Trocknungsbedingungen nach der Ernte den Gehalt der einfachen indolischen Komponenten wie Isatan A, Isatan B und Indican sowie der komplexeren indolischen Verbindung am Beispiel von Tryptanthrin beeinflussen.

Tatsächlich wurde ein vollständiger Abbau von Isatan A/B bei der Trocknung festgestellt, (s. Kap. 6.4.1.), während ein Anstieg der Gehalte an Tryptanthrin (s. Kap. 6.2.2.) und Indican (s. Kap. 6.4.2.) mit steigenden Trocknungstemperaturen verzeichnet wurde. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist davon auszugehen, dass die Indoxylderivate Isatan A/B und Indican nicht nur

Precursoren der Farbpigmente Indigo/Indirubin (s. Kap. 1.3.2.) darstellen, sondern auch Vorstufen weiterer, komplexerer Indolverbindungen sind, von denen das Alkaloid Tryptanthrin nur ein Beispiel ist. Betrachtet man die Strukturvielfalt dieser indolischen Verbindungen, so ist vorstellbar, dass die Entstehung solcher Molekülgrundkörper ähnlich dem kombinatorischen Prinzip in der Chemie verläuft. Dabei können an der Bildung dieser Verbindungen nur Indolkörper als Bausteine beteiligt sein (Indigo, Indirubin, Tryptanthrin). Die Kombination von Indolkörpern mit anderen Verbindungen des Sekundärstoffwechsels ist auch möglich (Bsp. Indolinon, Isaindigoton, s. Kap. 1.3.2.). Inwiefern an der Entstehung dieser Verbindungen Enzyme beteiligt sind oder ob einige Verbindungen auch nicht-enzymatisch durch den Einfluss von Luftsauerstoff entstehen können, muss in weiteren Arbeiten noch abgeklärt werden. Die Entstehung komplexer Verbindungen dürfte in allen Organismen möglich sein, die Indolglucoside (Indoxylderivaten) als Intermediate des Stoffwechsels besitzen. So identifizierte z.B. eine Japanische Arbeitsgruppe (Yoshikawa et al. 1998) das Calanthosid (Indol-S,O-Bidesmosid) als Precursor für das Tryptanthrin, Indirubin und Isatin neben Glucoindican (Indicandiglucosid) in *Calanthe*-Arten (Orchidaceae). Aber auch in Pilzen (Hosoe et al. 1999) wurde Tryptanthrin neben Indigo, Indirubin, Isatin und einem neuen Alkaloid indolischer Struktur (Schizocommunin) gefunden.

Die Herkunft bzw. der Biosyntheseweg der Indoxylderivate in *Isatis* ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt. Es existieren aber bereits ein paar Ansätze, die sich aus anderen Arbeiten ergeben und im folgenden Kapitel dargestellt werden sollen.

7.1. Überlegungen zur Biogenese der Indoxylderivate

Herkunft des Indolkörpers

Erste Untersuchungen zur Klärung der biosynthetischen Herkunft der Indoxylderivate im Hinblick auf Isatan B wurden bereits durch Schraudolf (1968) durchgeführt. Schraudolf fand, dass bei Fütterung von markiertem ^{14}C -Indol an Keimlinge von *Isatis tinctoria* oder *Isatis glauca* das markierte Indol in Isatan B eingebaut wird. Die Fütterung von markiertem ^{14}C -DL-Tryptophan führte jedoch zu keiner signifikanten Markierung von Isatan B. Auch in den 90er Jahren beschäftigten sich einige Arbeitsgruppen mit der Biogenese der Indigo-

Precursoren in höheren Pflanzen. Sie konnten ebenfalls den Einbau von Indol, nicht aber von Tryptophan in Indican und Isatan B bestätigen (Xia und Zenk 1992, Kim et al. 1995). Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass die Biogenese der Indigo-Precursoren im Indolstoffwechsel nicht über das Tryptophan, sondern über einen anderen Weg verlaufen muss.

1993 wurde durch Normanly et al. ein Tryptophan-unabhängiger Biogenese-Weg für die Biosynthese des Auxins Indol-3-essigsäure bzw. für Indol in *Arabidopsis thaliana* entdeckt.

Nach diesen Untersuchungen ist es möglich, dass Indole bzw. die Indol-3-essigsäure (IAA) aus Chorisminsäure \rightarrow Anthranilsäure \rightarrow N-Phosphoribosylanthranilsäure (PRA) \rightarrow 1-(o-carboxyphenylamino)-1-deoxyribulosephosphat (CDRP) über Indol-3-glycerolphosphat (IGP) gebildet werden.

Es ist nicht auszuschließen, dass die Indolkörper der Indigo-Precursoren auf diesem vom Tryptophan unabhängigen Weg entstehen. Dies würde den Einbau von markiertem Indol statt Tryptophan in Indican und Isatan B erklären.

Die bisherigen Arbeiten zur Biogenese des Pflanzenhormons Indol-3-essigsäure (*Arabidopsis thaliana*) zeigen, dass der Sekundärstoffwechsel der Indolkörper recht komplex ist und dass verschiedene Biosynthesewege existieren, die zu den unterschiedlichen indolischen Metaboliten führen. So ist die Biogenese der Indol-Glucosinolate vom Tryptophan abhängig (Mikkelsen et al. 2000, Smolen und Bender 2002), daneben gibt es aber auch Wege, in denen Tryptophan nicht involviert ist (Normanly et al. 1993, Bartling et al. 1994).

Verknüpfung mit Glucose

In einem zweiten Schritt wird der Indoxylrest durch ein Enzym mit der Glucose verknüpft, um den Indolkörper vor Oxidation zu schützen. Die Existenz eines solchen Enzyms (Indoxyl-UDPG-glucosyltransferase) konnte sowohl in *Baphicacanthus cusia* durch Marcinek et al. (2000) als auch in *Polygonum tinctorium* (Indicansynthase) durch Minami et al. (2000) festgestellt werden.

Aus Indoxyl und Glucose entsteht so Indican.

Entstehung von Isatan B und Isatan A aus Indican

Die ungewöhnliche Zuckerkomponente, die in Isatan A und Isatan B an das Aglykon geknüpft ist, wurde bisher nur in wenigen Arbeiten beschrieben. Erstmals konnte Junior 1984 die β -D-ribo-Hexopyranosid-3-ulose als glykosidischen Bestandteil in Serrulosid, einem Iridoidglykosid nachweisen. Es folgten weitere Arbeiten, in denen dieser offensichtlich seltene Zucker auch in anderen Iridoidglykosiden (Gering et al. 1987, Iwagawa und Hase 1989, Hannedouche et al. 1999), in Herzglykosiden (Yamauchi et al. 1987, Abe et al. 1988, Rhenius et al. 1997), acyclischen Monoterpenglykosiden (Calis et al. 1993) sowie in den Wurzeln der Bärentraube (Jahodar et al. 1986) gefunden werden konnte.

Dagegen konnten keine Arbeiten recherchiert werden, in denen die 5-Ketogluconsäure als pflanzlicher Sekundärmetabolit beschrieben wird, vielmehr ist sie nur als mikrobieller Metabolit (Buchanan et al. 1974) oder als Vorstufe für die Synthese von L(+)-Tartarsäure in *Pelargonium* (Saito et al. 1984) bekannt.

Für die Entstehung dieses seltenen Zuckers könnte eine Oxidoreduktase verantwortlich sein, die Indican in Isatan B konvertiert. Oxidoreduktasen, die die C-2 Position von Zuckern oxidieren, sind bereits in höheren Pflanzen beschrieben worden, der Nachweis von pflanzlichen Oxidoreduktasen, die die C-3 Position des Zuckers oxidieren, steht im Moment noch aus. Ein entsprechendes Enzym, eine C-3 oxidierende Pyranose-Dehydrogenase, wurde von Volc et al. (2002) aus dem Pilz *Agaricus meleagris* isoliert. Dieses Enzym kann verschiedene nicht-reduzierender Zucker in die 3-Ketoform konvertieren. Dabei wird oft nur der terminale Glucopyranosylrest (z.B. Sucrose, Melezitose, Erlöse) oxidiert. Es sind aber auch Oxidationen an beiden C-3-Positionen eines Disaccharides (C-3, C-3') am Beispiel der Trehalose nachgewiesen worden. Dieses Enzym konnte so auch Indican in Isatan B umwandeln (persönliche Mitteilung J. Volc). Damit scheint das Aglykon für die Oxidation des Zuckers nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die Verknüpfung der C-6 Position des Ketozuckers im Isatan B mit einem Malonylrest zum Isatan A könnte ebenfalls ein enzymatischer Schritt sein, der durch eine Acyltransferase erfolgt. Möglicherweise überträgt diese Transferase auch Acylreste auf die Glucose im Indicanmolekül. Zu welchem Zeitpunkt und Zweck die Acylierung in C-6 des Zuckers erfolgt, ist noch nicht bekannt. Denkbar ist, dass die Acylierung an C-6 und die Oxidierung an C-3 der Glucose als Aktivierungsschritt dient, der weiterführenden Biosynthese-Schritten

vorgeschaltet ist, denn die Intermediate Isatan A/B sind im Vergleich zum Indican sehr viel instabiler.

Im folgenden Schema (s. Abb. 7.1.1.) sind die oben aufgeführten Ansätze noch einmal zusammengefasst. Ob die Überlegungen zum Biosyntheseweg richtig sind, müsste aber in weiteren Untersuchungen z.B. unter Einsatz markierter Verbindungen abgeklärt werden.

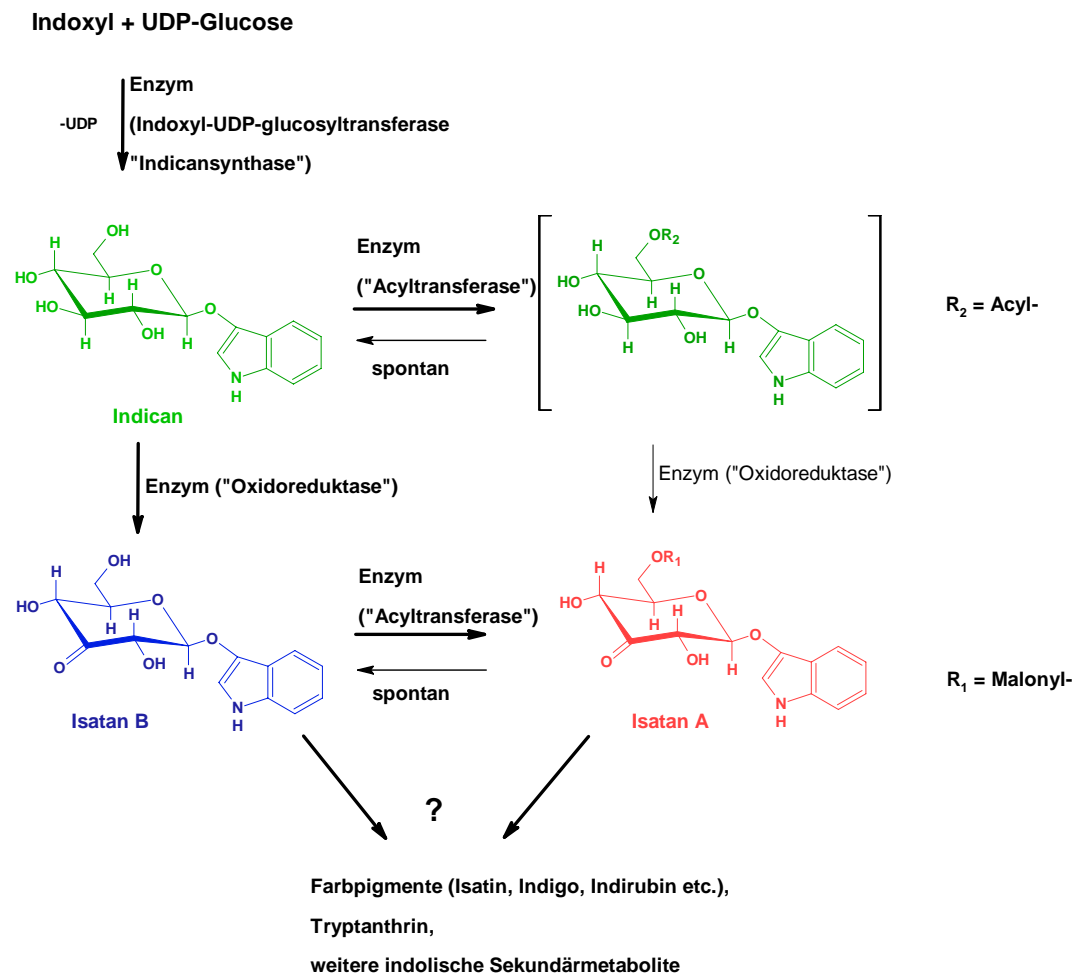


Abb. 7.1.1.: Mögliche Biogenese von Indican, Isatan B und Isatan A

Der dargestellte Weg würde erklären, warum bei der Trocknung ein Anstieg des Indican- und Tryptanthringehaltes festzustellen ist und parallel dazu ein Abbau von Isatan A/B stattfindet. Durch den Wasserverlust während des Trocknungsprozesses werden alle Enzyme zunehmend inaktiviert. Einige Enzyme könnten dabei sensibler auf den Wasserverlust reagieren („Oxidoreduktase“) und ihre Aktivität schneller verlieren als andere („Indicansynthase“). Die Inaktivierung der Oxidoreduktase führt zur Blockierung der Umwandlung von Indican in

Isatan B und dies führt zur Anhäufung dieses relativ stabilen Indoxylderivates während der Trocknung.

Die höheren Indicangehalte, die durch Trocknung bei Raumtemperatur, vor allem aber bei 40°C-Trocknung erreicht werden, sind wahrscheinlich auch auf einen Abbau indicanähnlicher Precursoren in Indican zurück zu führen. Denkbar ist weiterhin, dass die Trocknungstemperatur von 40°C zu Beginn des Trocknungsvorganges zwar in der Umgebungsluft des Trockenschrankes gemessen wird, durch die beginnende Verdunstung des Wassers werden die Blätter jedoch zunächst gekühlt, d.h. die Temperatur in den Blättern liegt am Anfang unter 40°C. Dieses Klima (optimale Temperatur, Wasser) am Anfang des Trocknungsprozesses könnte aber eine entscheidende Voraussetzung für die Aktivität der Indicansynthase darstellen und kurzfristig zu einer erhöhten Umsetzung von Indol und UDP-Glucose zu Indican führen.

Auf diese Weise ist es vielleicht auch die Aktivität der pflanzeigenen β -Glucosidasen zu Beginn der 40°C-Trocknung erhöht, dies führt zur Bereitstellung von Indol durch Spaltung der Indolglucoside (Isatan A/B) und unter Einwirkung von Luftsauerstoff werden zwei Indolkörper oxidativ zu Tryptanthrin gekoppelt. Möglich ist aber auch, dass Isatan A/B, die durch den oxidierten Zuckerrest instabiler sind, einfach durch die erhöhte Temperatur schneller spontan zerfallen und damit als Indol-Quelle dienen. Die Entstehung von Tryptanthrin könnte daher durch die Aktivität bestimmter Enzymen verstärkt werden. Da aber auch bei der weiteren Lagerung getrockneter Blattproben Tryptanthrin noch minimal gebildet wird (s. Kap. 6.2.2.), kann eine nicht-enzymatische Umwandlung aus Vorstufen auch nicht ausgeschlossen werden. Selbst das stabile Indican könnte durch lange Lagerung und Einwirkung von Luftsauerstoff langsam zerfallen und damit immer noch eine Quelle für die Tryptanthrinbildung (und andere Verbindungen) darstellen.

7.2. Ausblick

Die Ausführungen zur Biosynthese sind im Moment noch hypothetischer Natur und es wurde hier versucht, einen ersten Zusammenhang aus den gewonnenen Daten, d.h. dem Abbau der drei Precursoren Isatan A, Isatan B und Indican und der Bildung von Tryptanthrin herzustellen. Aus diesem Grund sind die Überlegungen zum derzeitigen Zeitpunkt noch nicht ausgereift und viele Beweise stehen noch aus. Um einen Überblick über das Stoffwechselgeschehen zu

bekommen, müssen auch die Gehalte aller anderen indolischen Sekundärmetabolite, z.B. der Indolglucosinolate und anderer Alkaloide (z.B. Indolin-2-on, **14**, s. Kap. 1.3.2.) mit in die Betrachtungen einfließen. Die Forschungsarbeiten stehen hier noch am Anfang. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um die Komplexität des Indol-Stoffwechsels und der daran beteiligten Intermediate zu verstehen. Und auch die Enzyme, deren Anwesenheit in dieser Arbeit aufgrund der vorhandenen Intermediate angenommen wurde, sind noch in *Isatis* nachzuweisen.

Mit dieser Arbeit konnte ein Beitrag zur Aufklärung der saisonalen und prozessbedingten Veränderungen einiger indolischer Sekundärmetabolite von *Isatis tinctoria* L. und zur Strukturaufklärung von Isatan B geleistet werden.

Auch vorhandene, pharmakologische Aspekte der anti-inflammatorischen Wirkung von Waidextrakt konnten um die Erkenntnisse der Hautpenetration von Tryptanthrin und durch die Identifizierung der α -Linolensäure als 5-LOX-Inhibitor ergänzt werden.

Materialien und Methoden

8. Pflanzenmaterial

Es wurden fünf verschiedene Herkünfte (Stämme) von *Isatis tinctoria* L. durch die Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft (TLL Dornburg) angebaut. Die Stämme „Jenaer Waid“, „Kieler Waid“, „Französischer Waid“ und „Schweizer Waid“ wurden durch Auslesezüchtung aus Saatgut verschiedener Herkunft erzeugt (Tab. 8.1.). Die Auslese positiver Einzelpflanzen und ihre Vermehrung unter Isolationsbedingungen wurde 1991/92 durch das TLL Dornburg begonnen und bis heute fortgesetzt. Bei dieser Auslesezüchtung erfolgt eine jährliche Selektion von Abweichern (Phänotyp) und eine isolierte Vermehrung der übrigen Pflanzen (negative Auslese). Der „Thüringer Waid“ stellt ein Genotypengemisch dar, das aus Sammlung verschiedenster Herkünfte (Firma Feige, Neudietendorf, Deutschland) erzeugt, jahrelang angebaut und nicht züchterisch bearbeitet wurde. Diese Herkunft gilt als Standard. Der Anbau erfolgte als randomisierte Blockanlage in 4 Wiederholungen auf Dauerfläche. Gedüngt wurde mit Stickstoff (120 kg N/ha unter Anrechnung des Gehaltes an leicht löslichem Stickstoff (N_{min}) im Boden, nach dem 1. und 2. Schnitt je 50 kg N/ha). Als Herbizide kamen Lantagran (1,5 kg/ha), Butisan (1,5 l/ha), Starane 180 (0,2 l/ha) und Lontrel 100 (1,2 l/ha) zum Einsatz. Die Aussaat erfolgte im zeitigen Frühjahr mit 5 kg Saatgut je Hektar (Reihenabstand 13,5 cm). Die Waidblätter wurden im ersten Jahr nach Aussaat 3x mit einem Grünfütterernter geschnitten (07/2001, 08/2001, 09/2001, 06/2002, 08/2002, 09/2002).

Bezeichnung	Herkunft	Ernten 2001 (Proben)	Ernten 2002 (Proben)
Thüringer Waid	Wildsammlung verschiedener Herkünfte aus Thüringen	07/01 (L/RT/40°C) 08/01 (--/RT/40°C)	06/02 (L/RT/40°C) 08/02 (L/RT/40°C)
Jenaer Waid	Botanischer Garten Jena	07/01 (L/RT/40°C) 08/01 (--/RT/40°C)	06/02 (L/RT/40°C) 08/02 (L/RT/40°C)
Kieler Waid	Botanischer Garten Kiel	07/01 (--/RT/40°C) 08/01 (L/RT/40°C)	06/02 (L/RT/40°C) 08/02 (L/RT/40°C)
Schweizer Waid	Botanischer Garten Lausanne/Schweiz	07/01 (--/RT/40°C) 08/01 (--/RT/40°C)	06/02 (L/RT/40°C) 08/02 (L/RT/40°C)
Französischer Waid	Wildsammlung am Chateau de Magrin, Toulouse/Frankreich	07/01 (L/RT/40°C) 08/01 (--/RT/40°C)	06/02 (L/RT/40°C) 08/02 (L/RT/40°C)

Tab. 8.1.: Waidproben für die Bestimmung des Gehaltes an Tryptanthrin, Isatan A, Isatan B, Indican

Legende:

L	=	schockgefrorene, lyophilisierte Probe
RT	=	bei Raumtemperatur getrocknete Probe
40°C	=	bei 40°C im Trockenschrank getrocknete Probe
--	=	Probe bei Lagerung verdorben (Schimmel)

9. Nacherntebehandlung

Die Probennahme des Blattmaterials (5 Waidherkünfte) erfolgte sofort nach dem Schnitt. Die frisch geernteten Waidblätter wurden mit Wasser gewaschen und nach Abtropfen des Wassers in Portionen zu je 500 g aufgeteilt. Als Nacherntebehandlungen wurden das Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff und anschließender Lyophilisation, die Trocknung bei Raumtemperatur, die Trocknung bei 40°C in einem Trockenschrank mit Umluftventilation und die Fermentation (nur 2001) durchgeführt.

Schockgefrierung: Dazu wurden die Blätter mit einer Schere zerkleinert, in 3 l-Plastikbechergläser gegeben, mit je 2,5 l flüssigem Stickstoff übergossen und unter kräftigem Rühren (Glasstab) tiefgefroren. Die gefrorenen Blätter wurden sofort in 2,5 l-Rundkolben überführt und lyophilisiert.

Trocknung bei Raumtemperatur: Frische, gewaschene Blätter wurden auf einem Filterpapier in einem abgedunkelten Raum ausgebreitet und in den ersten 3 Tagen der Trocknung 2x täglich, später 1x täglich gewendet. Während der Trocknung wurden Raumtemperatur und Luftfeuchte aufgezeichnet.

Trocknung bei 40°C: Dazu wurden die frischen, gewaschenen Blätter auf einem mit Filterpapier ausgelegten Ofenrost ausgebreitet und in den ersten 3 Tagen der Trocknung 2x täglich, später 1x täglich gewendet. Während der Trocknung wurden Luftfeuchte und Temperatur im Trockenschrank protokolliert. Durch Bestimmung der Blattmasse (täglich) wurde der Trocknungsfortschritt bei allen drei Trocknungsarten untersucht. Die Masse des verwendeten Frischmaterials und der getrockneten Blätter wurden zur Bestimmung des Trocknungsverlustes aufgezeichnet. Nach Erreichen der Massekonstanz wurden die getrockneten Blätter in 1 l-Braunglasflaschen abgefüllt, verschlossen und bis zur Extraktion dunkel bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

Fermentation: Je 500 g frisches Blattmaterial wurden mit einer Schere zerkleinert, in 2 l-Erlenmeyerkolben überführt, mit 500 ml Wasser versetzt und die Kolben mit luftdurchlässigen Wattestopfen verschlossen. Die Vergärung der Waidblätter erfolgte in einem abgedunkelten Raum bei Raumtemperatur. Der pH-Wert der Gäransätze wurde anfangs alle 1-2 Tage (Tag 1-10), später alle 4-7 Tage (Tag 10-25) mit einem pH-Meter (s. Kap. 12.1.) gemessen. Nach 10 Tagen wurde das vergorene Blattmaterial vom Gärssaft durch Filtration (Mullgewebe, 2-fache Lage) abgetrennt und der Saft noch 15 Tage weitervergoren, bis ein pH-Wert von ca. 6,5 erreicht war. Durch Lyophilisation konnte das Wasser aus den Gärssäften entfernt werden. Der getrocknete Rückstand wurde bis zur Extraktion in verschlossenen Glasgefäßen dunkel (Raumtemperatur) aufbewahrt (Abschlussbericht 1999, TLL Dornburg).

10. Extraktionen

10.1. Beschleunigte Lösungsmittlextraktion (ASE)

Mit dieser Extraktionsmethode wurden zwei verschiedene Extraktarten hergestellt. Für die Tryptanthrin-Quantifizierung in Extrakten und die Mikrofraktionierungen wurden lipophile, CH_2Cl_2 -Extrakte und für die Bestimmung des jahreszeitlichen Gehaltes an Indoxylvorstufen (Isatan A, Isatan B und Indican) MeOH-Extrakte hergestellt.

Die Extraktionen wurden auf einer Dionex ASE 200-Anlage (s. Kap. 19.1.) durchgeführt. Die Proben (getrocknete Waidblätter) wurden dazu in einer Zentrifugalmühle pulverisiert (Sieb 1,5 mm) und in 22 ml Extraktionskartuschen eingefüllt (je nach Probe 2-10 g gemahlene Waidblätter je Kartusche). Bei der Herstellung der Extrakte wurden keine Entfettungsschritte vorgeschaltet. Die Extraktionsbedingungen für die Herstellung beider Extrakte sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Parameter	Extraktion mit CH_2Cl_2 oder MeOH
Extraktionszyklen /-dauer	2 x 5 min
Druck, Temperatur	120 bar, 60°C
Vorheizzeit	1 min
Heizzeit	5 min
Flush	100 %
Purge (mit N_2)	120 s

Tab. 10.1.1.: Extraktionsparameter der Beschleunigten Lösungsmittlextraktion (ASE)

Aus den Extraktlösungen wurde das Lösungsmittel (CH_2Cl_2 oder MeOH) am Rotationsverdampfer entfernt (Wasserbadtemperatur max. 30°C), die Extrakte wurden in 1 ml Probengefäße (HPLC-vials mit Schraubverschluss) überführt und im Tiefkühlschrank (-32°C) gelagert.

10.2. Extraktion mit überkritischen Gasen (SFE)

Die SFE-Extraktion wurde auf der Pilotanlage der Adalbert-Raps GmbH Freising/Weihenstephan durchgeführt. Dazu wurden 21,2 kg Waidblätter einer Mischung der fünf ausgewählten Herkünfte (s. Kap. 8) aller Ernten des Jahres 2001 (Juli, August, September), die nach der Ernte auf einem Bandtrockner bei 60°C getrocknet wurden, unter folgenden Bedingungen an der SFE-Pilotanlage extrahiert: Extraktionsmittel CO₂, Druck 700 bar, Temperatur 50°C, Modifier Ethanol. Die Menge an Rohextrakt betrug 1,38 kg und nach dem Dekantieren 411,8 g. Der Gehalt an Tryptanthrin im SFE-Extrakt (Chargenbezeichnung: 01/2002, 174,5 g) wurde mit 0,23 % bestimmt.

(Charakterisierung des SFE-Extraktes mit HPLC-fingerprint, Massenspur und Tryptanthrinquantifizierung siehe Anhang).

10.3. Turbomazeration

150 g gefrorene Waidblätter (Jenaer Waid, Ernte 08/2001, nach Ernte sofort bei –32°C eingefroren) wurden mit 450 ml MeOH in einem Turbomixer (Waring® blender, Modell 38BL45) 2 min lang mit maximaler Rührgeschwindigkeit extrahiert und die Extraktlösung durch ein Leinensäckchen vom Pflanzenrückstand abgepresst und durch ein Papierfilter filtriert. Der ausgepresste Rückstand wurde auf diese Weise noch 2x extrahiert und alle Extraktlösungen wurden vereinigt. Unter Vakuum konnte das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer aus der Extraktlösung entfernt werden. Dabei betrug die Wasserbadtemperatur max. 30°C. Der erhaltene Extrakt (ca. 5 g) wurde in Wasser resuspendiert (Ultraschallbad), im Methanolbad eingefroren und lyophilisiert. Die Lagerung des Extraktes bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte unter Schutzgas (Argon) bei –32°C (Glaskolben, Plastikstopfen).

11. Synthesen

11.1. Tryptanthrin

Die Synthese erfolgte nach der Vorschrift von Friedländer / Roschdestwensky (1915). Für einen Ansatz wurden 20 g gepulvertes Isatin in 400 ml Wasser (2 l-Erlenmeyerkolben) suspendiert und unter Schwenken des Kolbens zum Sieden erhitzt (Bunsenbrenner, Dreifuß). Zu der siedenden Lösung wurden 20 g Kaliumpermanganat spatelweise in kleinen Portionen (starke CO₂-Entwicklung) hinzugegeben. Starke Schaumbildung durch CO₂-Entstehung wurde durch Schwenken des Erlenmeyerkolbens und durch Zugabe von Wasser aus einer Spritzflasche vermindert. Nach beendeter Kaliumpermanganat-Zugabe wurde in die Reaktionslösung Schwefeldioxid eingeleitet. Für die Schwefeldioxid-Darstellung wurde zu Natriumsulfit (50 g, in Zweihalskolben) Schwefelsäure (hergestellt aus 100 ml konz. H₂SO₄, 96 %ig + 100 ml aqua pur.) aus einem auf den Zweihalskolben aufgesteckten Tropftrichter vorsichtig hinzugetropft. Entstehendes Schwefeldioxid-Gas wurde über ein Gasableitungsrohr aus Glas, das an der anderen Öffnung des Zweihalskolbens angebracht wurde, in die siedende Reaktionslösung überführt. Das Einleiten des Gases wurde nach Aufhellen und Absetzen eines flockigen Niederschlages aus der zuvor braunen Reaktionslösung beendet. Wasserverluste wurden während der Synthese durch Zugabe von Wasser ausgeglichen. Nach Abkühlung des Reaktionsgemisches wurde der Niederschlag über eine Fritte (G3) abgetrennt und über 48 Stunden in einem Exsikkator über Phosphorpentoxid unter Vakuum getrocknet. Der grünlich – braune Niederschlag wurde mit Chloroform extrahiert und die Tryptanthrin enthaltene Chloroform-Lösung durch Filtration über Watte vom ölig-schmierigen Rückstand (Synthesereste) abgetrennt. Aus der wässrigen Mutterlauge wurde restliches Tryptanthrin durch 3-faches Ausschütteln mit Chloroform extrahiert. Das in Lösung befindliche Tryptanthrin wurde durch Abdampfen des organischen Lösungsmittels gewonnen und über Nacht im Exsikkator unter Vakuum über Calciumchlorid getrocknet. Die Umkristallisation von Tryptanthrin erfolgte durch Lösen des gelben Rückstandes in einem Liter siedendem Methanol. Die nach Abkühlen in der Mutterlauge gewachsenen gelben, nadelförmigen Tryptanthrinkristalle wurden über ein Filter abgesaugt und im Exsikkator (Vakuum) für die Bestimmung der Ausbeute und die weitere Charakterisierung getrocknet. Mit diesem Reaktionsansatz erhält man ca. 2,5 – 3 g Tryptanthrin (Ausbeute 15-20 %).

Zur Charakterisierung des synthetisch dargestellten Tryptanthrin (Chargenbezeichnung: 01/2001) wurden folgende Untersuchungen durchgeführt und mit kommerziell erhältlichem Tryptanthrin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Charge: 67F-3529) als Referenz verglichen: Bestimmung des Schmelzpunktes, Aufnahme von IR, UV/VIS, MS, und ^1H -NMR – Spektren sowie Überprüfung der Reinheit mit HPLC und DC. Die Identität konnte bestätigt werden. Die HPLC-Reinheit des synthetischen Tryptanthrin liegt bei 100 %. ($\lambda=254, 387 \text{ nm}$). (Die Ergebnisse sind tabellarisch im Anhang zusammengefasst.)

11.2. Deutiertes Tryptanthrin

Die Synthese des deuterierten Tryptanthrins erfolgte ausgehend vom d_5 -Anilin über d_5 -Isonitrosoacetanilid und d_4 -Isatin (Sandmeyer 1919). Deutiertes Isatin wurde weiter nach der Vorschrift von Friedländer /Roschdestwensky (1915) zu d_8 -Tryptanthrin umgesetzt.

Der Einsatz von deuterierten Lösungsmitteln, auch als Spülflüssigkeiten beim Waschen der Rohprodukte nach den Filtrationsschritten, ist bei dieser Mehrstufensynthese essentiell, da sonst durch verstärkten Rücktausch ein d -Tryptanthringemisch mit unvollständig deuterierten Molekülen ($d_8/d_7/d_6/d_5/d_4$ -Tryptanthrin) entsteht.

Für einen Ansatz wurden in einem 50 ml Becherglas 5 g d_5 -Anilin (0,05 mol, 98 % Isotopenreinheit) in deuteriertem Wasser (32,5 ml, Isotopenreinheit 99,9 %) durch Zusatz von 2 ml Salzsäure (32 %) unter Rühren gelöst. In einem 1 l-Erlenmeyerkolben wurden 8,9 g Chloralhydrat (0,05 mol) in 130 ml deuteriertem Wasser gelöst und nacheinander 140,4 g Natriumsulfat-Decahydrat (0,4 mol) und 12 g Hydroxylaminhydrochlorid (0,2 mol), das in einem Becherglas vorher in 54 ml deuteriertem Wasser gelöst wurde, zugesetzt.

Das Gemisch wurde umgehend und unter Schwenken des Erlenmeyerkolbens zum Sieden erhitzt, (Bunsenbrenner, Dreifuß) für 3-4 min am Sieden gehalten und anschließend unter einem kalten Wasserstrahl (ca. 5-10 min) schockartig abgekühlt. Dabei fielen weiße Kristalle von d_5 -Isonitrosoacetanilid aus. Diese wurden über eine Fritte von der Mutterlauge abgetrennt, mit deuteriertem Wasser (3 x 50 ml) nachgewaschen und in einem Exsikkator über Phosphorpentoxid und unter Vakuum über 48 h getrocknet. Die Ausbeute an d_5 -Isonitrosoacetanilid betrug 8,4 g (95 %).

Getrocknetes *d*₅-Isonitrosoacetanilid (8,4 g, 0,05 mol) wurde vorsichtig in kleinen Portionen und unter Rühren zu 8 ml deuterierter Schwefelsäure (0,15 mol, 99,5 % Isotopenreinheit) gegeben. Dabei wurde die Temperatur des Reaktionsgemisches mit einem Thermometer überprüft, um ein Ansteigen der Reaktionstemperatur über 70°C zu vermeiden (Minderung der Ausbeute). Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionsmischung auf 100 ml Eis, das aus deuteriertem Wasser hergestellt wurde, gegeben. Das rote Präzipitat wurde über eine Fritte abgesaugt, mit deuteriertem Wasser nachgewaschen (3 x 50 ml) und in einem Exsikkator über Phosphorpentoxid und unter Vakuum über 72 h getrocknet. Die Ausbeute an *d*₄-Isatin betrug 3,0 g (41 %).

Getrocknetes *d*₄-Isatin (3 g, 0,02 mol) wurde in 60 ml deuteriertem Wasser suspendiert (1 l-Erlenmeyerkolben) und zum Sieden (Bunsenbrenner, Dreifuß) erhitzt. Unter Schwenken des Erlenmeyerkolbens wurden in das siedende Reaktionsgemisch 3 g Kaliumpermanganat (0,02 mol) in kleinen Portionen zugesetzt. Starke Schaumbildung durch CO₂-Entstehung wurde durch Schwenken des Erlenmeyerkolbens und durch Zugabe von deuteriertem Wasser aus einer Spritzflasche vermindert. Nach beendeter Kaliumpermanganat-Zugabe wurde in die Reaktionslösung Schwefeldioxid eingeleitet. Dieses wurde frisch aus Natriumsulfit (50 g, in Zweihalskolben) und Schwefelsäure (hergestellt aus 100 ml konz. H₂SO₄ + 100 ml aqua pur.), die aus einem auf den Zweihalskolben aufgesteckten Tropftrichter auf das Natriumsulfit getropft wurde, erzeugt. Entstehendes Schwefeldioxid-Gas wurde über ein Gasableitungsrohr aus Glas, das an der zweiten Öffnung des Zweihalskolbens angebracht wurde, in die siedende Reaktionslösung überführt. Das Einleiten des Gases wurde nach Aufhellen und Absetzen eines flockigen Niederschlages aus der zuvor braunen Reaktionslösung beendet. Wasserverluste wurden während der Synthese durch Zugabe von deuteriertem Wasser ausgeglichen. Nach Abkühlung des Reaktionsgemisches wurde der Niederschlag über eine Fritte (G3) abgetrennt, mit 3 x 50 ml deuteriertem Wasser gewaschen und über 48 h in einem Exsikkator über Phosphorpentoxid unter Vakuum getrocknet. Der grünlich – braune Niederschlag wurde 3x mit Chloroform extrahiert und die *d*-Tryptanthrin enthaltene Chloroform-Lösung durch Filtration über Watte vom ölig-schmierigen Rückstand (Synthesereste) abgetrennt. Das in Lösung befindliche Tryptanthrin wurde durch Abdampfen des organischen Lösungsmittels (Rotationsverdampfer, Wasserstrahlpumpe) gewonnen und über Nacht im Exsikkator unter Vakuum über Calciumchlorid getrocknet. Die Umkristallisation von *d*-Tryptanthrin erfolgte durch Lösen des gelben Rückstandes in siedendem Methanol. Nach Abkühlen fielen gelbe, nadelförmige *d*-Tryptanthrinkristalle aus

der Mutterlauge aus, die über ein Filter abgesaugt und im Exsikkator unter Vakuum getrocknet wurden. Die Ausbeute an *d*-Tryptanthrin betrug 540 mg (21,8 %).

Zur Überprüfung des Syntheseverlaufes wurden die Synthesezwischenstufen *d*₅-Isonitrosoacetanilid und *d*₄-Isatin charakterisiert (Ergebnisse siehe Anhang). Die Identifizierung des Syntheseendproduktes *d*₈-Tryptanthrin erfolgte durch die Bestimmung des Schmelzpunktes, die Aufnahme der IR, UV/VIS, MS, und ¹H-NMR – Spektren und die Überprüfung der Reinheit mit DC und HPLC. Als Vergleich diente undeutertes Tryptanthrin (Charge 01/2001). (Die Ergebnisse sind im Anhang tabellarisch zusammengefasst.)

12. Mikrodialyse

12.1. Herstellung einer Mikrodialyse – Sonde

Die Mikrodialysemembran (Cuprophane[®], i.d. 200 µm, s. Kap. 19.8.) wurde auf eine Länge von 15 cm zugeschnitten. Auf der einen Seite der Membran wurde ein Führungsdraht (Länge 20 cm, Edelmetalldraht, 0,1 mm, s. Kap. 19.8.), der vorher mit einem in Ethanol getränkten Wattetupfer gereinigt wurde, in die Membran auf einer Länge von ca. 10 cm eingeschoben. Das andere Ende der Membran (ca. 5 cm, drahtfrei) wurde in einen PTFE – Schlauch (0,5 mm i.d., Länge ca. 15-20 cm) eingeführt und mit Cyanoacrylatkleber fixiert. Die fertige Mikrodialyse-Sonde wurde über 24 h an der Luft getrocknet und anschließend in 70 %igem Ethanol bis zum Einsatz aufbewahrt. Auf diese Weise wurden ca. 50 Mikrodialyse-Sonden auf Vorrat hergestellt.

12.2. Herstellung der Testlösungen

Es wurden tryptanthrinangereicherte Extraktlösungen (Grundlage: SFE-Extrakt 01/2002) und reine Tryptanthrinlösungen in Aceton (geometrische Reihe) hergestellt. Die kleinste Konzentration an Tryptanthrin (0,115 mg/ml = 0,5 g SFE-Extrakt in 10 ml Aceton, SFE-Extraktlösung I) richtete sich dabei nach dem nativen Gehalt von Tryptanthrin im ungespikten SFE-Extrakt (0,23 %). Die Extraktlösungen II bis V wurden dagegen mit ansteigenden Mengen an Tryptanthrin versetzt (gespikt). Als Vergleich zu den Extraktlösungen I-V wurden reine Tryptanthrinlösungen identischer Tryptanthrinkonzentration hergestellt. Die Konzentrationen an Tryptanthrin in den Extraktlösungen (SFE I-V) und den reinen Tryptanthrinlösungen (I-V) sind im folgenden (Tab. 12.2.1.) zusammengestellt:

Nr.	Trypt.-konz.	Extraktlsg. (in 10 ml Aceton)	Reine Lsg. (in 10 ml Aceton)
I	0,115 mg/ml	0,5 g Extrakt	1,15 mg Trypt.
II	0,23 mg/ml	0,5 g Extrakt + 1,15 mg Trypt.	2,30 mg Trypt.
III	0,46 mg/ml	0,5 g Extrakt + 3,45 mg Trypt.	4,60 mg Trypt.
IV	0,92 mg/ml	0,5 g Extrakt + 8,05 mg Trypt.	9,20 mg Trypt.
V	1,84 mg/ml	0,5 g Extrakt + 17,25 mg Trypt.	18,40 mg Trypt.

Tab. 12.2.1.: Zusammensetzung der Testlösungen für die Mikrodialyse

12.3. Verlegung der Mikrodialysemembranen in der Haut

Als Hautmodell wurde die Haut des Spitzbeins vom Schwein genutzt. Für die Mikrodialyse-Experimente wurde stets frisches Material (vom Schlachthaus) eingesetzt. Die Verlegung der Mikrodialysemembran erfolgte nur an hämatomfreien, blutfreien, intakten Hautbereichen. Dazu wurde eine Kanüle (21 Gauge, 0,80 x 40 mm) in die Haut in einer Tiefe von ca. 1 mm parallel zur Hautoberfläche, ohne diese zu verletzen, eingebracht. Anschließend wurde eine Mikrodialyse-Sonde durch die Kanüle hindurch in die Haut eingefädelt. Dabei wird die Führungsdraht-gestärkte Seite der Membran an der Spitze der Kanüle vorsichtig eingeschoben (Hauteingang) und bis zur anderen Seite der Kanüle (Hautausgang) so lang vorgeschoben, bis der Führungsdraht sicht- und greifbar wird. Mit Hilfe des Führungsdrahtes wird die Membran so weit gezogen, bis das PTFE-Schlauchende, das die Mikrodialysemembran auf der anderen Seite umgibt, ca. 5 mm vor dem Hauteingang liegt. Das andere Ende des PTFE-Schlauches wird an den Adapter der Spritze (1 ml) angeschlossen. Die Spritze wurde vorher mit der Perfusionslösung (isoton. Kochsalzlösung) gefüllt und in die Pumpe eingespannt. Danach wird der Führungsdraht vorsichtig aus der Membran (in Richtung Hautausgang) herausgezogen. Zur Testung der Funktionstüchtigkeit der verlegten Membran (Dichtigkeit an den Klebstellen Membran / PTFE – Schlauch) und zur Entfernung von Luftblasen aus der Membran wurde die Spülfunktion (flush) der Pumpe (erhöhte Flussrate) benutzt. Nachdem die Dichtigkeit der Mikrodialyse-Sonde überprüft und alle Luftblasen entfernt waren, wurde die Kanüle durch vorsichtiges Herausziehen (sonst Verletzung der Membran möglich) aus der Haut entfernt (in Richtung Hautausgang) und somit die Mikrodialysemembran in der Haut endgültig platziert. Durch Fixierung des PTFE – Schlauches am Hauteingang (mit Heftpflaster auf der Haut), konnte ein Wegrutschen der Membran aus der Haut sowie ein Perfusionsstau durch evtl. Einknicken der empfindlichen Membran verhindert werden. Die Ausgangsseite der Membran (bzw. Hautausgangsseite), auf der das Dialysat aufgefangen wird, wurde auf die benötigte Länge (bis ins Probenvial) mit einer Schere gekürzt. Auf diese Weise wurden zwei Membranen im Abstand von ca. 5 cm zueinander in der Haut verlegt, da die Mikrodialysepumpe mit zwei Kanälen betrieben werden kann.

Nach Verlegung der zwei Membranen in der Haut wurden zwei Testfelder auf der Hautoberfläche eingerichtet. Dazu wurde je ein Glasring (i.d. 12 mm, Höhe 15 mm) auf das Hautareal oberhalb der Mikrodialysemembranen mit Cyanoacrylatkleber so aufgeklebt, dass die in der Haut liegende Mikrodialysemembran durch das Zentrum des Glasringes verläuft.

Der Abstand zwischen Glasring und Ein – und Ausgang der Membran (bzw. aus der Haut heraus) betrug stets ca. 5 mm.

12.4. Mikrodialyse und Probengewinnung

Für die Equilibrierung des Systems wurden nun beide Membranen für ca. 30 min mit der Perfusionslösung bei einer Flussrate von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgespült. Das Dialysat der Equilibrierungszeit wurde bereits in 1 ml HPLC-vials mit 300 μl Mikro-Einsätzen aufgefangen und diente bei der Quantifizierung als Negativkontrolle (Blank). Anschließend wurden je 50 μl der Testlösungen (Extraktlösung und reine Tryptanthrinlösung, beide mit identischen Tryptanthrinkonzentrationen) auf die beiden Testfelder (A und B) mit einer Eppendorffpipette aufgegeben, die Glasringe mit einem Deckel abgedeckt und sofort zwei neue Probenvials (Dialysate 0-30 min) angehängt. Die Flussrate während der Mikrodialyse betrug 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, alle 30 min wurden die Probenvials gewechselt. Die Perfusionsdauer betrug 5 h (10 Fraktionen). Als Perfusionslösung diente 0,9 %ige, isotonische Kochsalzlösung. Die Mikrodialyse-Versuche wurden für jede Tryptanthrinkonzentration (I-V) 3-fach ($n = 3$) ausgeführt.

12.5. Herstellung der Kalibrierlösungen und der internen Standardlösung

Für die Kalibrierung wurden zunächst zwei Stammlösungen, eine Analyt – Stammlösung (Tryptanthrin, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in DMSO) und eine interne Standard – Stammlösung (d_8 -Tryptanthrin, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in DMSO) hergestellt und je 100 μl beider Stammlösungen wurden mit isoton. Kochsalzlösung zu 100,0 ml (Endkonzentration je 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ Tryptanthrin bzw. d_8 -Tryptanthrin) verdünnt. Beide Lösungen wurden gemischt, um folgende Kalibrierlösungen (s. Tab. 12.5.1.) herzustellen:

Nr.	Volumen. Analytlsg. (1ng/μl)	Volumen IS (1ng/μl)	Volumen isoton. NaCl- lsg.	Analyt / IS (ng/μl)	Analyt / IS (ng) on column)
1	800 μl	1000 μl	200 μl	0,4 / 0,5	8 / 10
2	400 μl	1000 μl	600 μl	0,2 / 0,5	4 / 10
3	200 μl	1000 μl	800 μl	0,1 / 0,5	2 / 10
4	100 μl	1000 μl	900 μl	0,05 / 0,5	1 / 10
5	50 μl	1000 μl	950 μl	0,025 / 0,5	0,5 / 10
6	50 μl	2000 μl	1950 μl	0,0125 / 0,5	0,25 / 10
Blank A	-----	1000 μl	1000 μl	0 / 0,5	0 / 10
Blank B	1000 μl	-----	1000 μl	0,5 / 0	10 / 0
Blank C	-----	-----	2000 μl	0 / 0	0 / 0

Tab. 12.5.1.: Zusammensetzung der Kalibrierlösungen 1-6

12.6. Probenvorbereitung für die HPLC – Injektion

Je 50 μl Dialysat wurden mit 50 μl internem Standard (*d*₈-Tryptanthrin, 1 ng/μl) versetzt, gemischt (Vortexer) und 3 x 20 μl (n = 3) dieser Mischung wurden in die HPLC injiziert.

Das Injektionsvolumen der Kalibrierlösungen (s. Tab. 12.5.1.) betrug 20 μl, jeder Kalibrierpunkt wurde 6-fach bestimmt (n = 6).

12.7. Analyse der Dialysate

Die Analyse der Dialysate wurde mit dem HPLC-System 2a (s. Kap. 14.3.) mit Massendetektion (s. Kap. 15.2.) durchgeführt. Bis zur Analyse wurden die gewonnenen Dialysate bzw. Kalibrierlösungen im Kühlschrank bei 2-8°C aufbewahrt.

Zur Berechnung des Tryptanthringehaltes in den Dialysaten wurde der funktionale Zusammenhang zwischen Analytmenge [x] (Tryptanthrin in ng on-column) und dem

Peakflächenverhältnis Analyt / Interner Standard $[f(x)]$ aus den Kalibrierpunkten gebildet und die Regressionsfunktion (linear) errechnet.

12.8. Ermittlung der Membrantiefe in der Haut

Die Tiefe der verlegten Mikrodialysemembranen wurde nach den Versuchen mit einem Ultraschallgerät (20 MHz, s. Kap. 19.1.) gemessen und lag zwischen 0,5 – 1 mm.

12.9. Ermittlung der *in vitro* Recovery

Zur Ermittlung der *in vitro* Recovery von Tryptanthrin an Cuprophan[®] mit isotonischer Kochsalzlösung als Perfusionslösung wurden zwei Mikrodialysemembranen (Herstellung s. Kap. 12.1.) in einer Objektträgerkammer (50 x 20 x 10 mm i.d.) verlegt. Dazu wurden je 2 kleine Löcher in die Seiten der beiden langen Kammerwände (insgesamt 4 Löcher) gebohrt, durch die dann die Membranen, parallel zueinander, eingefädelt wurden. Nach Anschluss an die Mikrodialyse-Pumpe wurden die Membranen zunächst für 30 min mit Kochsalzlösung bei einer Flussrate von 2 µl/min perfundiert (Äquilibration). Nach 30 min wurden 2 ml einer Tryptanthrinlösung definierter Konzentration (0,7 ng/µl Tryptanthrin in 0,9 % iger NaCl-Lsg.) in die Glaskammer vorsichtig eingefüllt und die Kammer mit einem Deckel verschlossen. Um Konzentrationsunterschiede zu vermeiden, wurde ein kleiner Magnet-Rührfisch in die Kammer gelegt und die Kammer auf einem Magnet-Rühr Tisch platziert. Es wurden alle 30 min Fraktionen gesammelt, die Gesamtdauer des Versuches betrug 3 h (ohne Äquilibrationzeit). Die Dialysate wurden mit internem Standard versetzt (s. Kap. 12.6.) und mittels HPLC-MS analysiert (s. Kap. 12.7.). Die reale Konzentration der Tryptanthrinlösung in der Kammer wurde ebenfalls durch HPLC-MS (s. Kap. 12.7.) bestimmt.

13. Mikrofraktionierungen und Bioassays

13.1. Mikrofraktionierungen

Für die aktivitätsbezogene Testung in Bioassay – Systemen wurden Extrakte (s. Tab. 13.1.1.) von *Isatis* auf der analytischen HPLC (s. Kap. 19.2.) mit dem HPLC-System 3 (s. Kap. 14.3.) fraktioniert. Dazu wurde 10 mg Extrakt in 1 ml CH₂Cl₂ gelöst (10 µg/µl) und 20 µl Extraktlösung (200 µg Extrakt) in die HPLC injiziert. Die Fraktionierung erfolgte in 96-well Mikrotiterplatten (Greiner, Frickenhausen) mit 18 s / well oder in Reagenzgläser (5 ml) mit 3 min / Reagenzglas. Peakkontrollierte Mikrofraktionierungen wurden je nach Peakbreite (min) manuell in Reagenzgläser oder in Eppendorffgefäßen (1,5 ml) aufgefangen.

Die in Mikrotiterplatten gesammelten Fraktionen wurden mit einem laminaren Luftstrom (LAF-Box) über ca. 72 h getrocknet. Die in Reagenzgläsern aufgefangenen Fraktionen wurden in einem Zentrifugalevaporator (s. Kap. 19.1.) getrocknet, in 500 µl MeOH aufgenommen, gelöst (Vortexer), in Eppendorffgefäße (1,5 ml) überführt und erneut im Zentrifugalevaporator (ca. 2 h, niedrigste Heizstufe mit 40°C) getrocknet. Bis zur Testung wurden die Fraktionen verschlossen bei –32°C aufbewahrt.

<i>Isatis</i> – Extrakt	Bioassay – Testungen / Fraktionierung	Tryptanthringehalt (im Extrakt)
SFE (Charge 01/2002)	5 – LOX – Inhibition / 11 Fraktionen zu 3min (Reagenzgläser)	0,23 %
CH ₂ Cl ₂ – ASE Pharmaplant Artern (Artern 1998)	QR – Induktion, CYP1a – Inhibition, (iNOS – Inhibition)	0,11 %
CH ₂ Cl ₂ – ASE TLL Dornburg (Jenaer Waid 2001, RT – Trocknung)	96-well Mikrotiterplatten (96 Fraktionen zu 18 s)	0,24 %

Tab. 13.1.1.: Übersicht über die in Bioassay – Tests eingesetzten Extrakte

13.2. Bioassays

13.2.1. Inhibition der 5 – Lipoxygenase (5 – LOX)

Dieser Test wurde extern durch die Firma Vitaplant (Witterswil, Schweiz) durchgeführt.

Es wurde die potentielle Hemmwirkung von 11 Fraktionen der Mikrofraktionierung auf die Produktion von Leukotrien B₄ (LTB₄) durch das Enzym 5-Lipoxygenase (5-LOX) bestimmt. Für die Bestimmung wurden Human – Granulozyten (differenzierte HL-60 Zellen) verwendet.

Probenvorbereitung: Für die Testung wurden die Mikrofraktionen in je 10 µl DMSO gelöst und vor dem Test mit PBS 1:5 verdünnt. Für den 5-LOX-Assay wurden je 5 µl der verdünnten Lösung der Fraktionen (in 20 % DMSO) verwendet. Die Endkonzentration an DMSO betrug 1 % in allen Assays.

Assay der Enzymaktivität: Die differenzierten Zellen (1×10^6 / well) wurden zunächst 15 min mit den Proben (Fraktionen) in PBS bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Arachidonsäure (10 µM) und Calcium – Ionophore (A 23187, 5 µM) gestartet und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Hemmwirkung der 11 Fraktionen wurden im Vergleich zu Kontrollassays (nur Lösungsmittel) bestimmt. Die Nullkontrollen wurden mit der Assaymischung ohne Stimulation mit Calcium – Ionophore durchgeführt.

Weitere Angaben zur Durchführung des Tests sind bei Bennett et al. (1993) und Liu et al. (1998) beschrieben.

13.2.2. Bestimmung der Chinonreduktase – Aktivität (QR – Induktion)

Dieser Test wurde extern durch das DKFZ Heidelberg durchgeführt.

Es wurde die Aktivität der Chinonreduktase durch die NADPH-abhängige Menadiol-vermittelte Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zum blau gefärbten Formazan bestimmt. Die Induktion der Chinonreduktase – Aktivität wurde aus dem Verhältnis der spezifischen enzymatischen Aktivität behandelter Zellen (Substanzen) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Lösungsmittel) berechnet.

Dabei wird der CD – Wert, d.h. die Konzentration an aktiver Substanz (µM) ermittelt, die die spezifische Enzymaktivität der Chinonreduktase verdoppelt. Als Positivkontrolle wurde β-Naphthoflavon (β-NF, CD = 0,033) eingesetzt.

Für die Bestimmung wurden Leberzellen der Maus verwendet.

Probenvorbereitung: Für die Testung wurden die Mikrofraktionen in je 5 µl DMSO / well angelöst und mit 45 µl Wasser verdünnt. Davon wurden je 10 µl auf die Zellplatten (Gesamtvolumen 200 µl) übertragen. Die Endkonzentration an DMSO betrug im Assay 1 %.

13.2.3. Bestimmung der Hemmwirkung auf die CYP 1a - Aktivität

Dieser Test wurde extern durch das DKFZ Heidelberg durchgeführt.

Es wurde die Aktivität der CYP 1a (Cytochrom P450, Familie 1, Unterfamilie A) mit der Umsetzung von 3-Cyano-7-ethoxycoumarin (CEC) zum fluoreszierenden 3-Cyano-7-hydroxycoumarin (CHC) durch eine Dealkylierungsreaktion gemessen. Dazu wurden Homogenisate von kultivierten H4IIE Rattenleberzellen, die mit 10 µM β -Naphthoflavon (β -NF) induziert wurden als Quelle für die CYP 1a – Aktivität benutzt. Die Zellen wurden nach 38 h durch Abschaben in 1 ml Plattenpuffer P (200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mit 10 mM $MgCl_2$) überführt und durch die Einwirkung von flüssigem Stickstoff aufgebrochen.

Probenvorbereitung: Die zu testenden Mikrofraktionen wurden in je 5 µl DMSO / well angelöst, mit 45 µl Wasser versetzt und noch einmal 1:10 für den Test verdünnt.

Reaktionsansatz: Je 10 µl der Mikrofraktionen wurden auf eine weitere 96-well Mikrotiterplatte übertragen und 100 µl des frisch hergestellten Reaktionsgemisches bestehend aus 5,2 µl 50 mM $NADP^+$ in Wasser, 4,4 µl 150 mM Glucose-6-phosphat in Wasser, 0,5 U Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, 0,1 µl 10mM CEC und 90,25 µl Puffer P wurden hinzugegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 90 µl Zellhomogenisat, das 1x durch eine 27 Gauge Injektionsnadel passiert und mit Puffer P auf eine Endproteinkonzentration von 50-100 µg/ml eingestellt wurde, gestartet. Die Konversionsrate von CEC in das fluoreszierende CHC wurde 40 min lang bei 37°C im Cytofluor 4000 Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-Reader (Anregungswellenlänge 408/20 nm, Emissionswellenlänge 460/40 nm) aufgenommen. Die Hemmung der enzymatischen Aktivität wurde im Vergleich zur CHC-Standardkurve berechnet. Als Positivkontrolle wurde der CYP 1a-Hemmer α -Naphthoflavon mit einer IC_{50} von 0,011 µM eingesetzt. Die Endkonzentration an DMSO betrug im Assay 1 %.

Weitere Angaben zur Durchführung der Tests sind bei Gerhäuser et al. (2002), Heiss et al. (2001), Crespi et al. (1997) und Gerhäuser et al. (1997) beschrieben.

14. Chromatographische Methoden

14.1. Dünnschichtchromatographie

DC – System 1

Dieses System wurde für die Identifizierung und Reinheitsprüfung von Tryptanthrin und d_8 – Tryptanthrin (Synthesen) entwickelt.

Material:	RP – 18 F _{254S} (Alufolie, Merck, Darmstadt), 5 x 10 cm (Start 1 cm)
Probe:	Tryptanthrin oder d_8 – Tryptanthrin (1 µg/µl in CHCl ₃) und Isatin (1 µg/µl in CHCl ₃ / MeOH 80:20)
Auftragsmenge:	4 µg Substanz (4 µl)
Fließmittel:	CHCl ₃
Laufstrecke:	8 cm
Detektion:	UV 254 nm / 366 nm
Auswertung:	visuell (Tryptanthrin gelb, R _f = 0,4; Isatin orange, R _f = 0,1)

DC – System 2a

Dieses System wurde für die Auftrennung polarer Waidextrakte und die Identifizierung der Indigoprecursoren (Isatan A, Isatan B, Indican) entwickelt.

Material:	Kieselgel 60 F ₂₅₄ (Alufolie, Merck, Darmstadt), 10 x 10 cm (Start 1 cm)
Probe:	polare Waidextrakte (MeOH – ASE – Extrakte) (c = 20 µg/µl in MeOH)
Auftragsmenge:	200 µg Extrakt (10 µl)
Fließmittel:	CHCl ₃ / MeOH / H ₂ O (60:35:5)
Laufstrecke:	7,5 cm
Detektion:	Besprühen mit 5 %iger HCl oder 5%iger NaOH, Entwicklung auf der Heizplatte (115°C)
Auswertung:	visuell: Isatan A / B blau nach NaOH – Behandlung (Isatan A: R _f = 0,44; Isatan B: R _f = 0,96)

Indican, Isatan A / B graublau nach HCl – Behandlung
(Indican: $R_f = 0,85$)

DC – System 2b

Dieses System diente der Überprüfung der Fraktionen auf Indigoprecursoren bei der Kieselgeltrennung (präparative Säulenchromatographie) des Waidextraktes. Alternativ dazu wurde auch DC-System 2a verwendet.

Material:	Kieselgel 60 F ₂₅₄ (Alufolie, Merck, Darmstadt), 10 x 10 cm (Start 1 cm)
Probe:	Fraktionen der KG 60 – Säulenchromatographie oder Sephadex LH-20 – Aufreinigungen
Auftragsmenge:	100 µg Fraktion (10 µl) bzw. 20 µl Fraktion
Fließmittel:	CHCl ₃ / MeOH / H ₂ O (80:18:2)
Laufstrecke:	8 cm
Detektion:	Besprühen mit 5 %iger NaOH, Entwicklung auf der Heizplatte (115°C)
Auswertung:	visuell: Isatan A / B blau nach NaOH – Behandlung (Isatan A: $R_f = 0,31$; Isatan B: $R_f = 0,55$)

DC – System 3

Dieses System wurde für die Gehaltsbestimmung der Indigoprecursoren (Isatan A, Isatan B, Indican) in polaren Waidextrakten aus DC – System 2a weiter entwickelt.

Material:	HPTLC – Platten Kieselgel 60 (Merck, Darmstadt), 10 x 10 cm (Start 1 cm)
Probe:	polare Waidextrakte (MeOH – ASE – Extrakte) (c = 20 µg/µl in MeOH)
Referenzen:	Isatan A (1,25 µg/µl), Isatan B (0,5 µg/µl) und Indican (0,5 µg/µl)
Auftragsmenge:	200 µg Extrakt (10 µl), 12,5 µg Isatan A (10 µl), 5 µg Isatan B (10 µl), 5 µg Indican (10 µl)

Fließmittel:	CHCl ₃ / MeOH / H ₂ O (60:35:5)
Laufstrecke:	7,5 cm
Detektion:	Tauchen in 5% ige HCl (Indican, Isatan A, Isatan B) oder 5% ige NaOH (nur Isatan A und Isatan B) für 4 s, Entfernen des restlichen Tauchreagenzes durch Warmluftstrom, dann Entwicklung auf der Heizplatte (115°C),
Auswertung:	densitometrisch: 380 nm (Indican nach HCl – Detektion, R _f = 0,85) oder 605 nm (Isatan A / Isatan B nach NaOH – Detektion, Isatan A: R _f = 0,44; Isatan B: R _f = 0,96)

DC – System 4

Dieses System diene der Identifizierung der α -Linolensäure im SFE – Extrakt von *Isatis tinctoria*.

Material:	KG 60 F ₂₅₄ (Alufolie, Merck, Darmstadt), 5 x 10 cm (Start 1 cm)
Probe:	<i>Isatis</i> – SFE – Extrakt (Charge 01/2002, 10 µg/µl in CH ₂ Cl ₂), α – Linolensäure (aus Mikrofraktionierg., in 50 µl MeOH)
Auftragsmenge:	200 µg Extrakt (20 µl), α – Linolensäure (20 µl)
Fließmittel:	Hexan / Toluol / EtOAc / MeOH (30:50:15:5)
Laufstrecke:	8 cm
Detektion:	Besprühen mit Godin`s Reagenz (s.u.), Entwicklung auf der Heizplatte (115°C),
Auswertung:	visuell (α – Linolensäure violett, R _f = 0,5)

Godins Reagenz:

Reagenzlösung A:

1 % Vanillin in EtOH,
3 %ige HClO₄
(50:50)

Reagenzlösung B:

10 %ige H₂SO₄ in EtOH

14.2. Präparative Säulenchromatographie

14.2.1. Trennung auf Kieselgel 60

Für die erste Auftrennung des methanolischen Waidextraktes (s. Kap. 10.3.) wurde eine mit Kieselgel gefüllte Säule (offene Säulenchromatographie) verwendet.

Material:	Kieselgel 60 (40 – 63 μm , Macherey – Nagel, Düren)
Säulenmaße:	7,5 x 50 cm (Gesamtlänge der Säule 70 cm, mit Laufmittelvorrat)
Laufmittel:	CHCl_3 / MeOH / H_2O 1 90:10:0 2 80:18:2 3 60:35:5
Flussrate:	30 ml/min
Probe:	Extrakt, aufgezogen auf Kieselgel 60

Säulenbefüllung: Ca. 1,2 kg KG 60 (40 – 63 μm) wurden in 2 l Laufmittel 1 (90:10:0) aufgeschlemmt und in die Säule luftblasenfrei eingefüllt (unterer Säulenausgang: Watteschicht). Nach 24 h (über Nacht) hatte sich die Kieselgelschicht gesetzt, dabei wurde ein Trockenlaufen der Säule unterbunden.

Extraktvorbereitung: Ein Aliquot (16,8 g) des lyophilisierten Extraktes (s. Kap. 10.3.) wurde in 600 ml Laufmittel 3 (60:35:5) suspendiert (2 l-Rundkolben, Ultraschallbad), der ungelöste Teil durch Filtration über Watte abgetrennt und zu dieser Extraktlösung 100 g Kieselgel (KG 60, 40 – 63 μm) hinzugegeben. Unter vermindertem Druck (Rotationsverdampfer mit Wasserstrahlpumpe) wurde der organische Anteil des Lösungsmittels vollständig abgedampft. Das restliche Wasser wurde nach Einfrieren (Methanolbad) durch Lyophilisation entfernt.

Trennung: 317 g der Kieselgel – Extrakt – Mischung wurden vorsichtig auf die Kieselgelschicht aufgestreut, dabei blieb die aufgestreute Extraktschicht (ca. 12 cm) stets von Laufmittel bedeckt. Durch Öffnen des Ablaufhahnes (vorsichtig, Flussrate ca. 10 ml/min) zog das Laufmittel in die extrakthaltige Kieselgelschicht ein (Laufmittelüberstand mind. 0,5 cm). Danach wurde vorsichtig erneut Laufmittel 1 aufgegeben und die Flussrate auf 30 ml/min erhöht. Nach ca. 2,5 h erfolgte der Wechsel auf Laufmittel 2 (80:18:2) und nach weiteren 3 h auf Laufmittel 3 (60:35:5). Bei Laufmittelwechsel wurde die Flussrate für ca. 30 min auf 10-

15 ml/min reduziert und danach wieder auf 30 ml/min erhöht. Die Trennung dauerte ca. 14 h. Es wurden je 4 l Laufmittel 1 und 2 und 10 l Laufmittel 3 verbraucht.

Fraktionierung: Die Fraktionen wurden in 1 l-Glasflaschen aufgefangen (ca. 30 min / Fraktion).

Detektion: Die Überprüfung der Fraktionen auf Vorhandensein der Indigoprecursoren Isatan A und Isatan B erfolgte mit Dünnschichtchromatographie (DC-System 2a / 2b, s. Kap. 14.1.).

Weiterverarbeitung: Nach Vereinigung zusammengehöriger Fraktionen wurde das Lösungsmittel aus den Fraktionen unter vermindertem Druck (Rotationsverdampfer, Wasserstrahlpumpe, Wasserbadtemperatur max. 30°C) entfernt und die Ausbeute der Fraktionen bestimmt.

Aufbewahrung: Die vereinigten Fraktionen (10) wurden in Rundkolben unter Schutzgas (Argon) bei -32°C bis zur weiteren Aufreinigung aufbewahrt.

14.2.2. Aufreinigung über Sephadex® LH-20

Die weitere Aufreinigung der Isatan A (Fraktion 10) und Isatan B (Fraktion 3) enthaltenen Fraktionen wurde über Sephadex® LH-20 durchgeführt. Zum Einsatz kamen zwei verschiedene Säulen. Die kleinere Säule wurde zur Austestung der Aufreinigungsbedingungen sowie für die Aufreinigung kleiner Mengen (100 mg), die große Säule für die Aufreinigung in größerem Maßstab (500 mg) genutzt. Bei beiden Säulen wurde mit leichtem Überdruck (geschlossenes Säulensystem) gearbeitet.

Material:	Sephadex® LH-20 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Säulenmaße:	kleine Säule: 2,5 x 45 cm große Säule: 5,5 x 90 cm
Laufmittel:	MeOH (redest.)
Pumpe:	LKB P-1
Flussrate:	kleine Säule: 2 ml/min (Pumpe: 5 x 10 Skalenteile) große Säule: 3-4 ml/min (Pumpe: 7 x 10 Skalenteile)
Probe:	100 mg Substanz, gelöst in 4,5 ml MeOH (kleine Säule) 500-800 mg Substanz, gelöst in 19 ml MeOH (große Säule)
Probenschleife:	5 ml (kleine Säule), 20 ml (große Säule)

Detektion:	254 nm (Uvicord II Detektor), Absorptionsbereich 0,5 AU (kleine Säule), 1 AU (große Säule), Standard 2 AU
Eingangssignal:	100 mV (Recorder)
Papiervorschub:	1 mm/min (kleine Säule) 0,5 mm/min (große Säule)
Fraktionierung:	4 min / Fraktion in Reagenzgläser (20 ml) mit Pharmacia LKB Superfrac (s. Kap. 19.1.)
Dauer der Aufreinigung:	ca. 2-3 h (kleine Säule), ca. 10-15 h (große Säule)
Aufreinigungsschritte:	2

Säulenbefüllung: Sephadex[®] LH-20 wurde zunächst 24 h in MeOH vorgequollen und anschließend luftblasenfrei in die Säule eingefüllt. Nach 48 h hatte sich die Sephadex-Schicht genügend gesetzt, dabei wurde ein Trockenlaufen der Säule unterbunden.

Probenvorbereitung: Ca. 100 mg (bzw. 500 mg) Substanz (Fraktion 3 mit Isatan B oder Fraktion 10 mit Isatan A) wurden in 4,5 ml (resp. 19 ml) MeOH gelöst. Ein evtl. ungelöster Rückstand (v.a. Fraktion 10) wurde durch Filtration über Watte von der Lösung abgetrennt.

Trennung: Nach Probenaufgabe über die Probenschleife wurde eine Flussrate von 2 ml/min (bzw. 4 ml/min) eingestellt. Der Fraktionssammler wurde erst 30 min (bei kleiner Säule) bzw. 3 h (bei großer Säule) nach Injektion der Probe gestartet.

Detektion: Während der Trennung wurde ein Chromatogramm ($\lambda=254$ nm) aufgezeichnet. Die Isatan A oder Isatan B enthaltenden Fraktionen wurden zusätzlich zum aufgezeichneten Chromatogramm mit Dünnschichtchromatographie (DC-System 2a / 2b, s. Kap. 14.1.) identifiziert.

Weiterverarbeitung: Nach Vereinigung zusammengehöriger Fraktionen wurde das Lösungsmittel aus den Fraktionen unter vermindertem Druck (Rotationsverdampfer, Wasserbadtemperatur max. 30°C) entfernt und die Ausbeute der Fraktionen bestimmt.

Aufbewahrung: Die aufgereinigten Indigovorstufen wurden in Rundkolben unter Schutzgas (Argon) bei -32°C aufbewahrt.

14.3. HPLC (Hochleistungsflüssigchromatographie)

HPLC – System 1a

Dieses System wurde für die Identifizierung und Reinheitsprüfung von Tryptanthrin und d_8 – Tryptanthrin (aus den Synthesen) entwickelt.

Säule:	LiChroCART® 125 x 4 mm i.d. Kartusche, LiChrospher 100 RP –18 (5 µm) (Merck, Darmstadt)
Laufmittel:	(A) Acetonitril / (B) Wasser (40:60) + 2 % Essigsäure, isokratisch 10 min
Flussrate:	1 ml/min
Säulenofen:	25°C
Detektion:	254, 387 nm (Spektren 190 – 700 nm)
Probe:	Tryptanthrin oder d_8 –Tryptanthrin (0,1 ng/µl in MeOH)
Injektionsvolumen:	20 µl (2 ng Tryptanthrin / d_8 –Tryptanthrin on column)
Retentionszeit:	7,4 min

HPLC – System 1b

Dieses System wurde für Injektionen mit Massendetektion ohne vorherige Auftrennung über eine HPLC – Säule (flow injection) genutzt. (Massenspektroskopie s. Kap. 15.1.)

Säule:	ohne (nur Verbindungsstück)
Laufmittel:	(A) Acetonitril / (B) Wasser (50:50) + 2 % Essigsäure, isokratisch 1 min
Flussrate:	1 ml/min
Säulenofen:	25°C
Detektion:	220 nm (Spektren 190 – 700 nm)
Probe:	Substanz (0,1 µg/µl)
Injektionsvolumen:	10 µl (1 µg Substanz)

HPLC – System 2a

Dieses System wurde für die Quantifizierung von Tryptanthrin in den Dialysaten der Mikrodialyse oder in *Isatis* – Extrakten (CH_2Cl_2 – ASE – Extrakte) unter Einsatz eines internen Standards (d_8 – Tryptanthrin) entwickelt.

Säule:	LiChroCART® 55 x 2 mm i.d., Purospher® STAR RP –18 endcapped (3 μm) Kartusche (Merck, Darmstadt)
Laufmittel:	(A) Acetonitril / (B) Wasser (40:60) + 2 % Essigsäure, isokratisch 5 min
Flussrate:	0,3 ml/min
Säulenofen:	25°C
Detektion:	254, 387 nm (Spektren 190 – 700 nm), Massen (SIM m/z 249 für Tryptanthrin und m/z 257 für d_8 – Tryptanthrin)
Injektionsvolumen:	10 μl (Extraktlösungen), 20 μl (Dialysate der Mikrodialyse)
Retentionszeit:	2,7 – 3,1 min
Umschaltventil:	zwischen HPLC und Massenspektrometer

HPLC – System 2b

Mit diesem HPLC – System wurde der Gehalt an Tryptanthrin in den folgenden Extrakten bestimmt: SFE – Extrakt (Charge 01/2002), CH_2Cl_2 – ASE – Extrakt Pharmaplant (*Isatis tinctoria* L. Pharmaplant Artern, 1998), CH_2Cl_2 – ASE – Extrakt Dornburg (*Isatis tinctoria* L. TLL Dornburg, „Jenaer Waid“, 2001, bei RT getrocknet).

Säule:	LiChroCART® 125 x 4 mm i.d. Kartusche, LiChrospher 100 RP –18 (5 μm) (Merck, Darmstadt)
Laufmittel:	(A) Acetonitril / (B) Wasser (40:60) + 2 % Essigsäure,
Flussrate:	1 ml/min
Gradient:	0-9 min 60 % B, 9-15 min 60 % B→5 % B, 15-19 min 5 % B
Säulenofen:	25°C
Detektion:	254, 387 nm (Spektren 190 – 700 nm),

	Massen (SIM m/z 249 für Tryptanthrin und m/z 257 für d_8 – Tryptanthrin)
Probe:	50 µl Extraktlösung (c = 10 µg/µl, in Isopropanol) + 100 µl interner Standard (d_8 – Tryptanthrin, c = 0,02 µg/µl) + 50 µl Isopropanol
Injektionsvolumen:	3 x 20 µl Probe
Retentionszeit:	7,0 – 7,3 min

HPLC – System 3

Mit diesem HPLC – System wurden die Mikrofraktionierungen (5-LOX-Tests, CYP 1a, QR-Reduktase, iNOS) durchgeführt.

Säule:	LiChroCART® 125 x 4 mm i.d. Kartusche, LiChrospher 100 RP –18 (5 µm) (Merck, Darmstadt)
Laufmittel:	(A) Acetonitril / (B) Wasser (40:60),
Flussrate:	1 ml/min
Gradient:	0-2 min 10 % A, 2-25 min 10 % A→100 % A, 25-30 min 100 % A
Säulenofen:	25°C
Detektion:	220, 254 nm (Spektren 190 – 700 nm),
Injektionsvolumen:	20 µl
Fraktionierung:	in Mikrotiterplatten (96-well – Format, 18 s / well) oder in Reagenzgläser (5 ml, 3 min / Reagenzglas)
Fraktionssammler:	Gilson (s. Kap. 19.1.)

15. Massenspektroskopische Methoden

15.1. Allgemeine Methode zur Bestimmung unbekannter Massen

Für die Bestimmung unbekannter Massen wurden die HPLC-Systeme 1b (flow injection) und 3 (s. Kap. 14.3., Aufnahme der Massenspur der Extrakte aus den Mikrofraktionierungen) in Kombination mit Massendetektion genutzt. Als Ionenquelle wurde das Turbo-Ion-Spray-Interface eingesetzt. Die Parameter für die Ionisierung waren:

Laufmittel HPLC:	Acetonitril / Wasser – Gemische (isokratisch oder Gradient)
Ionisierungszusätze:	2 % Essigsäure (Massenspur Extrakte), 0,1 % Ameisensäure oder 10 mM Ammoniumacetat
HPLC –Flussrate:	1 ml/min
Split an der Ionenquelle:	1:4
Ionisierung:	positiv / negativ
Temperatur der Ionenquelle:	350°C
Ion spray voltage (IS):	4,5 kV
Declustering Potential (DP):	20 V
Focusing Potential (FP):	230 V
Entrance Potential (EP):	10 V
Scanbereich:	100 – 1000 amu
Equilibrierung der Ionenquelle:	1 h

15.2. Quantifizierung von Tryptanthrin

Für die Quantifizierung von Tryptanthrin in den Dialysaten der Mikrodialyse und in Extrakten wurden die HPLC-Systeme 2a / 2b (s. Kap. 14.3.) in Kombination mit Massendetektion genutzt. Zum Schutz der Ionenquelle vor starker Verschmutzung kam ein Schaltventil (s. Kap. 19.2.), mit dem nur das Zeitfenster des Tryptanthrinpeaks in das Massenspektrometer geleitet wurde, zum Einsatz. Die Parameter für die Ionisierung und anschließende Massendetektion waren:

Ionisierungszusatz:	2 % Essigsäure
Split an der Ionenquelle:	no split (Flussrate 0,3 ml/min) 1:4 (Flussrate 1 ml/min)
Ionisierung:	positiv
Temperatur der Ionenquelle:	350°C
Ion spray voltage (IS):	4,8 kV
Declustering Potential (DP):	50 V
Focusing Potential (FP):	220 V
Entrance Potential (EP):	10 V
SIM 1 (Analyt Tryptanthrin):	248,5 – 249,5 amu
SIM 2 (Interner Standard)	256,5 – 257,5 amu
Equilibrierung der Ionenquelle:	4 h

15.3. Bestimmung der Masse der Indigoprecursoren über Infusion

Die Bestimmung der Massen von Isatan A und Isatan B erfolgte durch Infusion der Substanzlösungen mit einer Spritzenpumpe. Die Parameter für die Ionisierung und anschließende Massendetektion waren:

Probelösungen:	1 mg/ml (Isatan A / B, gelöst Acetonitril / Wasser 50:50)
Ionisierungszusatz:	0,1 % Ameisensäure
Spritze:	1 ml Glasspritze (Hamilton)
Flussrate:	0,6 ml/h
Split an der Ionenquelle:	no split
Ionisierung:	positiv / negativ
Temperatur der Ionenquelle:	keine (Heizung aus)
Ion spray voltage (IS):	4,5 kV
Declustering Potential (DP):	25-30 V (Isatan B), 35 V (Isatan A)
Focusing Potential (FP):	120 V (Isatan B), 150 V (Isatan A)
Entrance Potential (EP):	8 V
Scanbereich:	100 – 1000 amu
Equilibrierung der Ionenquelle:	keine (kein Heizen der Ionenquelle)

16. Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen

16.1. Bestimmung des Schmelzpunktes

Die Bestimmung des Schmelzpunktes erfolgte auf einem Heizblock unter mikroskopischer Betrachtung (Kofler Heiztisch, Boetius Bestimmungsapparatur, s. Kap. 19.1.). Dazu wurde die zu untersuchende Probe dünn auf ein Deckgläschen ausgestrichen, mit einem zweiten Deckgläschen abgedeckt und auf den Heizblock gelegt. Als Schmelzpunkt oder –bereich wurde die Temperatur bestimmt, bei der der größte Teil der Kristalle im Schmelzen war. Der Schmelzpunkt wurde als Mittelwert aus drei Bestimmungen ermittelt.

16.2. Aufnahme von IR – Spektren

Zur Aufnahme des IR – Spektrums wurde ein Pressling hergestellt. Dazu wurden ca. 0,3 mg Substanz in 300 mg getrocknetem KBr in einer Kugelmühle (ca. 2-3 min) verrieben und gemischt, anschließend mit Hilfe einer Presse (s. Kap. 19.1.) bei einem Druck von 8 t über 3 min zu einem klaren Pressling geformt und im IR-Spektrophotometer vermessen.

16.3. Aufnahme von UV/VIS – Spektren

Zunächst wurde ein UV/VIS – Spektrum der zu untersuchenden Substanz in Lösung (MeOH) über den Wellenlängenbereich $\lambda = 200\text{-}800\text{ nm}$ am Beckman-Photometer (s. Kap. 19.2.) aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Dreifachbestimmung der Absorption in den charakteristischen Absorptionsmaxima der Substanz und die Berechnung des Absorptionskoeffizienten ε ($d = 1\text{ cm}$, c in mol/l).

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad \varepsilon [\text{l} / \text{mol cm}] = A / c \cdot d$$

16.4. Optische Drehung

Zur Bestimmung der optischen Drehung am Polartronic (s. Kap. 19.2.) wurde die zu untersuchende Substanz gelöst (1 mg/ml in MeOH) und in einem 10 cm Glasrohr bei $\lambda = 589,4$ nm vermessen ($n = 3$). Als Nullwert diente das Lösungsmittel (Methanol).

16.5. Strukturaufklärung mit NMR

Die zu untersuchende Probe wurden mind. 24 h gefriergetrocknet, für die Messung in deuteriertem Lösungsmittel gelöst und über eine mit fettfreier Watte gefüllte Pasteurpipette in ein NMR – Röhrchen (5 mm, NMR 535-PP, Wilmad Glas, Buena, USA) filtriert und darin vermessen. Alle verwendeten Glasgeräte und die Watte waren fettfrei und trocken.

Die Aufnahme der ^1H -NMR – Spektren für Tryptanthrin und d_8 – Tryptanthrin (in CDCl_3) sowie für die Synthesestufen (Isonitrosoacetanilid, Isatin, in MeOD) erfolgte auf einem Bruker Avance DRX 400 (400,13 MHz). Die Datenbearbeitung wurde auf einer SGI Indy-Workstation und XWinNMR – Software durchgeführt.

Die Strukturaufklärung von Isatan A und Isatan B (^1H , ^{13}C , ^1H ^1H – COSY, HMBC, HSQC) erfolgte nach Spektrenaufnahme auf einem Bruker Avance DRX 500 mit 5 mm TXI Kryo – Probenkopf (500,13 MHz für ^1H und 125,75 MHz für ^{13}C).

17. Analytik zur Bestimmung des Gehaltes an Isatan A, Isatan B, Indican und Tryptanthrin

17.1. Densitometrie

Die Bestimmung des Gehaltes an Isatan A, Isatan B und Indican in methanolischen ASE – Extrakten (s. Kap. 8-10) wurde nach Entwicklung auf HPTLC – Platten densitometrisch durchgeführt. Die Entwicklung der HPTLC – Platten wurde wie in Kap. 14.1. (DC-System 3) beschrieben, durchgeführt.

Bei dieser Methode wurden die Indigoprecursoren mit NaOH oder HCl zu Farbpigmenten umgesetzt und die Intensität der Farbe durch Remissionsmessung bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen. Die Intensität der Farbe (x), ausgedrückt als Peakfläche, wurde in funktionalen Zusammenhang zu den aufgetragenen Precursormengen (y) gebracht und ergab für alle drei Precursoren funktionale Zusammenhänge 2. Ordnung mit $f(x) = ax^2 + bx + c$.

Die Messwellenlängen (380 nm: Indicanbestimmung, 605 nm: Isatan A/B – Bestimmung) wurden durch Aufnahme von Remissionspektren ermittelt. Jeder Precursor konnte durch seinen R_f – Wert (Isatan A 0,44; Isatan B 0,96; Indican 0,85) auf der HPTLC – Platte identifiziert werden.

Zur Ermittlung der Kalibrierkurven für Isatan A, Isatan B und Indican wurden ansteigende Precursormengen (geometrische Reihe) auf HPTLC-Platten (10 x 10 cm) aufgetragen, entwickelt und sofort vermessen. Dazu wurden Kalibrierlösungen mit folgenden Konzentrationen an Precursoren in MeOH hergestellt:

Stammlösung 1	0,5 µg/µl Isatan B und Indican
Stammlösung 2	0,125 µg/µl Isatan B und Indican
Stammlösung 3	20 µg/µl Isatan A
Stammlösung 4	1,25 µg/µl Isatan A
Stammlösung 5	2 µg/µl Indican

Die Auftragung der Referenzlösungen (Stammlösungen 1-5) erfolgte mit dem Desaga Auftragegerät (s. Kap. 19.1.) unter Einhaltung der folgenden Abstände: Bandenbreite 5 mm, Abstand zwischen den Zonen 4-5 mm.

Die Volumina an Stammlösungen und die damit aufgetragenen Precursormengen sind in der folgenden Tabelle (Tab. 17.1.1.) zusammengefasst.

Platte	Bestimmung von	Precursormengen (μg)	Volumen Stammlösung
1, 2, 3	Indican (380 nm) (n = 3)	0,25 / 0,5 / 1 / 2 / 4 / 8 / 16 / 32 / 64	2 / 4 / 8 μl SL 2 4 / 8 / 16 μl SL 1 8 / 16 / 32 μl SL 5
4, 5, 6	Isatan B (605 nm) (n = 3)	0,25 / 0,5 / 1 / 2 / 4 / 8	2 / 4 / 8 μl SL 2 4 / 8 / 16 μl SL 1
7, 8, 9	Isatan A (605 nm) (n = 3)	2,5 / 5 / 10 / 20 / 40 / 80 / 160	2 / 4 / 8 / 16 / 32 μl SL 4 4 / 8 μl SL 3

Tab. 17.1.1.: Übersicht über die aufgetragenen Precursormengen für die Kalibrierkurven

Die zu untersuchenden Extrakte wurden in MeOH gelöst (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Ultraschallbad) und 6 x 10 μl jeder Extraktlösung (je Startzone 200 μg Extrakt) manuell aufgetragen [Platte 1 mit 3 x 10 μl Extraktlösung zur HCl – Entwicklung (n = 3) und Platte 2 mit 3 x 10 μl Extraktlösung zur NaOH – Entwicklung (n = 3)]. Die in HCl entwickelte Platte wurde bei 380 nm vermessen, um den Gehalt an Indican zu bestimmen, die in NaOH entwickelte Platte wurde bei 605 nm vermessen, um den Gehalt an Isatan A und Isatan B zu ermitteln.

Mit Hilfe der Kalibrierkurven konnten die unbekannten Mengen an Indican, Isatan A und Isatan B berechnet und so der Gehalt dieser Precursoren im Extrakt bzw. in der getrockneten Droge bestimmt werden.

17.2. Quantifizierung von Tryptanthrin in Extrakten

Die Bestimmung des Tryptanthringehaltes in CH_2Cl_2 -ASE-Extrakten (s. Kap.8-10) wurde nach HPLC-Trennung (HPLC-System 2a, Kap. 14.3.) wie bei der Mikrodialyse mit dem Massenspektrometer als Detektor (s. Kap. 15.2.) durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit HPLC-MeOH hergestellt.

Probenvorbereitung: 1 mg Extrakt wurde in 1,0 ml MeOH gelöst (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Stammlösung Analyt: 1,5 mg Tryptanthrin wurde in 10,0 ml MeOH gelöst (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

500 μl dieser Stammlösung wurden zu 25,0 ml mit MeOH verdünnt (3 $\text{ng}/\mu\text{l}$).

Stammlösung Interner Standard: 1,5 mg d_8 -Tryptanthrin wurde in 10,0 ml MeOH gelöst (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). 500 μl dieser Stammlösung wurden zu 25,0 ml mit MeOH verdünnt (3 $\text{ng}/\mu\text{l}$).

Injektionslösung: 50 μl Extraktlösung (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden mit 50 μl Interner Standardlösung (3 $\text{ng}/\mu\text{l}$) gespikt.

Injektion: 3 x 10 μl (gespikte Extraktlösungen)

5 x 10 μl (Kalibrierlösungen)

Zeitfenster: Mittels Umschaltventil zwischen HPLC und MS wurde nur der Tryptanthrinpeak ($t_R = 3,1$ min, d.h. 2,2-4,2 min) in das Massenspektrometer geleitet.

Kalibrierlösungen: Die Analytlösung (3 $\text{ng}/\mu\text{l}$) und die Lösung des internen Standards (3 $\text{ng}/\mu\text{l}$) wurden wie folgt gemischt (Tab. 17.2.1):

Nr.	Volumen Analytlsg. (μl)	Volumen IS (μl)	Volumen MeOH (μl)	Analyt / IS ($\text{ng}/\mu\text{l}$)	Analyt / IS (ng) on column)
1	500	500	0	1,5 / 1,5	15 / 15
2	250	500	250	0,75 / 1,5	7,5 / 15
3	125	500	375	0,38 / 1,5	3,75 / 15
4	125	1000	875	0,19 / 1,5	1,88 / 15
5	125	2000	1875	0,094 / 1,5	0,94 / 15
Blank A	-----	1000	1000	0 / 1,5	0 / 15
Blank B	1000	-----	1000	1,5 / 0	15 / 0
Blank C	-----	-----	1000	0 / 0	0 / 0

Tab. 17.2.1.: Zusammensetzung der Kalibrierlösungen 1-5

Zur Berechnung des Tryptanthringehaltes in den Extrakten wurde der funktionale Zusammenhang zwischen Analytmenge [x] (Tryptanthrin in ng on column) und dem Peakflächenverhältnis Analyt / Interner Standard [f(x)] aus den Kalibrierpunkten gebildet und die Regressionsfunktion (linear) errechnet.

18. Enzymatische Hydrolysen

Substratlösung:

2 mg Substanz (Isatan A, Isatan B oder Indican) wurden in 2000 μl KH_2PO_4 -Puffer pH 6,6 gelöst ($c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Enzymlösung 1: β -Glucosidase

0,5 mg β -Glucosidase (s. Kap. 12.6.) wurden in 500 μl KH_2PO_4 -Puffer pH 6,6 ($c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) gelöst.

Enzymlösung 2: β -Glucuronidase

0,5 mg β -Glucuronidase (s. Kap. 12.6.) wurden in 500 μl KH_2PO_4 -Puffer pH 6,6 ($c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) gelöst.

Enzymfreie Blanklösung:

KH_2PO_4 -Puffer pH 6,6 (Pufferlösung pH 6,6 R)

500 μl Substratlösung wurde mit 500 μl Enzymlösung 1 oder 500 μl Enzymlösung 2 oder mit 500 μl KH_2PO_4 Puffer pH 6,6 (Blank) versetzt (Eppendorffgefäße, 1,5 ml) und bei 37°C für 4 h unter Schütteln inkubiert (Eppendorf Thermomixer), dabei setzt die Bildung von Indigo nach ca. 30 min sichtbar ein. Nach beendeter Inkubation wurde zum Ansatz 1 ml BuOH zugegeben und geschüttelt (Vortexer), nach Phasentrennung sammelt sich das gebildete, schwer lösliche Indigo an der Phasengrenzfläche an. Die Auswertung erfolgte visuell im Vergleich zum Blank.

19. Geräte, Chemikalien, Materialien

19.1. Allgemeine Laborgeräte

Auflichtmikroskop:	Axiovert 25 Mikroskop (Carl Zeiss, Jena)
ASE – Anlage:	Dionex ASE 200 (Dionex GmbH Idstein)
DC – Auftragegerät:	AS 30 TLC – Applikator (Desaga, Heidelberg)
DC-UV-Detektion:	CAMAG UV-Betrachter 3 mit UV Lampen 254/366nm (CAMAG, Berlin)
Eppendorff – Thermomixer:	Modell 5436 (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA)
Fraktionssammler:	Pharmacia LKB Superfrac (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Schweden)
Fraktionssammler:	Gilson FC 2004 (Gilson Medical Electronics, Middleton, USA)
Heizplatte:	Thermoplate S (Desaga, Heidelberg)
Kugelmühle:	Narva DDR-GM 9458 (Narva, Branderbisdorf)
Lyophyllisation:	Alpha 2-4 (Heraeus – Christ, Osterode) Freezemobile 12XL (VirTis, Gardiner, USA)
Mikrodialysepumpe	CMA 102 Zweikanalpumpe (Microdialysis AB, Solna, Schweden)
pH – Messgerät:	Knick pH Meter 761 Calimatic (Kick GmbH, Berlin)
Presse:	T40 Autopress (Graseby Specac, Kent, England)
Rotationsverdampfer:	Rotationsverdampfer VV 200 mit Pumpensystem Rotavac control (Heidolph Instruments, Kelheim) oder Vakuumpumpe PC 520 (Vacuubrand GmbH, Wertheim)
Schmelzpunktgerät:	Kofler-Heizplatte Nagema (VEB Wägetechnik Rapido, Radebeul) mit Boetius Bestimmungsapparatur (Pentacon, Dresden)
Schneidmühle:	IKA Universalmühle M 20 (Janke & Kunkel GmbH, Staufen)
Turbomixer:	Waring Blender Modell 38 BL 45 (Waring Products, New Hartford, USA)

Trockenschrank:	WTB Binder (WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen)
Ultraschallbad:	Sonorex RK 100 (Bandelin Electronic, Berlin)
Ultraschallsonde:	Labsonic U (B. Braun, Melsungen)
Ultraschallscanner:	20 MHz (Cortex Technology, Hasund, Dänemark)
Ultra-Zentrifugalmühle:	Retsch ZM 100 (Retsch GmbH, Haan)
Vortexer:	Modell VF2 (Janke & Kunkel, Staufen)
Waagen:	Sartorius Micro MC 210 P, Sartorius analytic, Sartorius basic (Sartorius, Göttingen)
Wasseraufbereitungssysteme:	Milli-Q RG (Millipore, Schwalbach) Sersdest SD 2800 (Seral, Ransbach-Baumbach)
Zentrifugalevaporatoren	SC 210A Speed vac Plus (Savant Instruments, Holbrook / NY, USA) Jouan RC 10.22. Evaporator – Zentrifuge mit Kühlfalle Jouan RCT 60 (Jouan GmbH, Unterhaching)
Zentrifugen:	Universal 30F (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) Universal 30RF (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)

19.2. Chromatographische und spektroskopische Geräte

Densitometer:	Desaga CD 60 (Desaga, Heidelberg)
Detektor LC (Sephadex):	Uvicord S II, Pharmacia LKB mit UV-Lampe 2 und 254nm-Filter sowie LKB Rec-2 chart recorder (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
HPLC – Anlagen:	HP 1100 series mit Entgaser, binärer Pumpe, Autosampler, Säulenofen, DAD – Detektor und Workstation mit Software HP ChemStation Version Rev. A. 0603 [509] 1990-1998 (Hewlett Packard, Palo Alto, USA), HP 1050 mit quaternärer Pumpe, HP 1040 M II DAD – Detektor, Workstation mit Software HP ChemStation Version Rev. A. 0603 [509] 1990-1998 (Hewlett Packard, Palo Alto, USA)

IR – Spektrometer:	Specord M 82 mit workstation und Software M82, Version 1.7 (Carl Zeiss, Jena)
LC-Pumpe:	Pharmacia LKB Pump P-1 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Massenspektrometer	API 165 Single Quadrupole, Turbo-Ion-Spray-Interface, (Applied Biosystems, Darmstadt)
Massenspektrometer (Feinmassebestimmung)	Mat 95 XL mit Micro – ESI interface (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA)
NMR	Bruker Avance DRX 500, DRX 400, NMR – Spektro – meter (Bruker, Fällanden, Schweiz)
Optische Drehung:	Polartronic E (Schmidt & Haensch GmbH, Berlin)
Umschaltventil HPLC/MS:	Modell E60-230 (Valco Instruments, Chicago, USA)
UV/VIS – Spektrometer:	Beckman DU 640 (Beckman, Carlsbad, USA)

19.3. Laufmittel / Lösungsmittel

Die Lösungsmittel für die chemischen und analytischen Verfahren entsprachen der p.a.-Qualität und wurden von Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Laborchemie Apolda bezogen. Für die HPLC wurden Lösungsmittel mit HPLC-Reinheit eingesetzt (Roth, Karlsruhe oder Merck, Darmstadt). Aqua pur. wurde über die Wasseraufbereitungsanlage (siehe Geräte) gewonnen. Für die Extraktion an der ASE-Anlage wurden redestillierte Lösungsmittel (Methanol, Dichlormethan) verwendet.

19.4. Chemikalien

Ameisensäure	Fluka (Sigma, Taufkirchen)
Ammoniumacetat	Fluka (Sigma, Taufkirchen)
Anilin, deuteriert (d_5 -Anilin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
Deuteriumoxid (D_2O)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Calciumchlorid (CaCl_2)	Roth, Karlsruhe
CDCl_3 (für NMR)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure, konz. (99,5%)	Fluka (Sigma, Taufkirchen)
Hydroxylaminhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Isatin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumpermanganat (KMnO_4)	Laborchemie, Apolda
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
MeOD (für NMR)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumsulfat-Decahydrat ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (Plättchen)	Merck, Darmstadt
Natriumsulfit (Na_2SO_3)	Fluka (Sigma, Taufkirchen)
Phosphorpentoxid (P_2O_5)	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl , 32%)	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (H_2SO_4 , 96%)	Laborchemie, Apolda
Schwefelsäure, deuteriert (D_2SO_4)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

19.5. Referenzsubstanzen

Tryptanthrin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Indican	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isatin	Fluka (Sigma, Taufkirchen)

19.6. Enzyme

β -Glucosidase aus Mandeln [E.C. 3.2.1.21]	Fluka (Sigma, Taufkirchen)
β -Glucuronidase aus <i>Helix pomata</i> Typ H-1 [E.C. 3.2.1.31]	Fluka (Sigma, Taufkirchen)

19.7. Adsorbentien und sonstige Materialien

Kieselgel 60 (40-63µm)	Macherey-Nagel, Düren
Sephadex [®] LH-20	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Adapter	Epiduralkatheter-Adapter (Braun, Melsungen)
Edelmetalldraht	Niro-Federdraht, 0,1 mm (Vogelsang / Hagen)
Glasringe (i.d. 12mm, Höhe 15mm)	Einzelanfertigung (Glasbläser)
Heftpflaster	Optiplast textil 5m x 1,25cm (WVP Pharma GmbH, Petersaurach)
Kanülen	Sterican 0,80 x 40mm (21G x 1 ½ , Gr.2) (Braun, Melsungen)
Mikrodialyse – Membranen	i.d. 200µm, cut-off 5000 Dalton (Gambro Dialysate, Hechingen)
PTFE – Schlauch	i.d. 0,5mm / Wandstärke 0,25mm (Merck, Darmstadt)
Sekunden – Kleber	Cyanoacrylatkleber Merck, Darmstadt)
Spritzen	1 ml Spritzen Luer lock

20. Summary

1. The anti-inflammatory activity of *Isatis tinctoria* L. (woad, Brassicaceae) was recently demonstrated in an *in vitro* pharmacological screening against anti-inflammatory targets. The alkaloid tryptanthrin was subsequently identified as a pharmacologically active compound with potent dual inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene synthesis (Danz et al. 2002b). Further investigations with *in vivo* pharmacological models of acute and chronic inflammation were carried out to compare the anti-inflammatory activity of the pure compound tryptanthrin versus *Isatis* extracts. In the TPA-induced mouse ear oedema, topical application of 0.5 mg/ear of dichloromethane or CO₂ extracts of *I. tinctoria* showed a significant anti-oedemateous effect, but the activity of tryptanthrin at 0.25 mg/ear was less pronounced (Recio et al. 2002). In a clinical study *Isatis* extracts proved to be more effective than pure tryptanthrin in preventing the experimentally induced irritant contact dermatitis (Heinemann et al. 2004).
2. On the basis of these unexpected findings the dermal penetration of tryptanthrin was investigated from pure alkaloidal solutions in comparison to tryptanthrin-containing woad extracts. Therefore, a cutaneous microdialysis model using *ex vivo* pig foreleg was developed and validated. Microdialysis probes were placed in the dermis of the pig skin parallel to the skin surface and perfused with isotonic NaCl solution. Test solutions containing increasing amounts of tryptanthrin were applied in test fields on the skin surface above the probes.
3. Measurable concentrations of tryptanthrin were already detected 30 min after application. The tryptanthrin concentrations in the dialysates increased faster when the alkaloid was applied in the extract matrix, and a dose-dependent increase in tryptanthrin concentrations in the dialysate was only observed for the *Isatis*-extracts, but not for pure compound tryptanthrin. Microscopic analysis showed that the pure compound crystallized from the solution but remained in an amorphous state in the extracts. Accompanying extract constituents may accelerate and increase the cutaneous penetration by acting as solubility enhancers for the poorly soluble compound tryptanthrin.
4. The analysis of the dialysate samples required a highly sensitive assay. Therefore, an isotope dilution ESI-LC-MS protocol using a short narrow bore HPLC column, *d*₈-tryptanthrin as an internal standard, and quantification of analyte and internal standard by SIM was developed and validated based on a recently published ESI-LC-MS assay for

- tryptanthrin (Danz et al. 2002a). For these purposes the internal standard d₈-tryptanthrin was synthesized.
5. The results of the pharmacological profiling against anti-inflammatory targets revealed that tryptanthrin was only in part responsible for the inhibition activity on 5-lipoxygenase (Danz et al. 2002a). To identify other active extract compounds a HPLC-based microfractionation combining on-line spectroscopy (HPLC-DAD-MS) with bioassay-tests was carried out. The extract compound α -linolenic acid, a unsaturated fatty acid, could identified as an inhibitor of 5-lipoxygenase.
 6. A preliminary screening was initiated to get first hints about the origin and formation of tryptanthrin. Earlier investigations of 67 leaf samples of woad had shown enormous differences in tryptanthrin concentrations (0,56 bis 16,74 x 10⁻³ %) between the samples (Danz et al. 2002b). These investigations did not take into account the influence of harvest-time and post-harvest treatments.
 7. Therefore five defined strains of woad were cultivated under identical conditions in field plots, harvested (July, August 2001 and June, August 2002) and aliquots of leaf samples were dried in three different ways. Shock frozen leaf samples as a reference afforded the metabolite pattern at the time of harvest. The influence of drying conditions on the spectrum of indolic metabolites, in particular on indoxyl derivates and tryptanthrin, was determined with leaf samples dried at room temperature and 40°C.
 8. Tryptanthrin concentrations in the CH₂Cl₂-extracts were detected by HPLC-ESI-MS. The drying temperatures played an important role in the formation of this secondary metabolite. In fresh leaves the amounts of this alkaloid were low (0,008-0,055 %). The tryptanthrin concentrations increased if leaves were dried at ambient temperature (0,06-0,207 %) but the highest tryptanthrin-levels were reached at 40°C (0,18-0,33 %). In addition the right time of harvest lead to higher tryptanthrin concentrations. Leaves harvested in August showed higher tryptanthrin levels (0,12 – 0,20 %) than samples from the June/July harvests (0,06 – 0,12 %).
 9. Along with tryptanthrin, the contents of the indoxyl derivates indican and isatan B as possible precursors were investigated in dependence of harvest time and drying conditions.
 10. First experiments on TLC with shock frozen leaf samples showed a complex pattern of indigo forming compounds with higher polarity than the known indigo precursors isatan B and indican. These highly unstable compounds underwent rapid post-harvest transformation and were not detected in air dried leaves. The major indigo precursor,

named isatan A, was isolated along with isatan B and identified by NMR. The full spectral dataset showed that the previous structure of isatan B as *indoxyl-5-ketogluconate* had to be revised to *indoxyl-O- β -D-ribohexo-3-ulopyranoside*. Isatan A was identified as *indoxyl-3-O-(6'-O-malonyl- β -D-ribohexo-3-ulopyranoside)*. Isatan B is a direct derivative of indican. Now the biogenetic relations between the indigo precursors in woad were in accord with general principles of secondary metabolite biosynthesis rather than with the previous structure proposal.

12. A method for the quantitative determination of indoxyl derivatives was established and validated. Extracts were separated on TLC and the concentrations of the three indigo precursors were measured by densitometry after visualization with HCl or NaOH. The amounts of isatan A were determined with 2-10 % whereas the isatan B contents were very low with 0,01-0,27 %. Shock frozen leaves contained the lowest indican amounts (0,4-0,9 %). Higher indican levels could be detected in air (1,5-3,2 %) or 40°C (0,7-3,0 %) dried leaf samples.
13. The formation of tryptanthrin and the disappearance of the major precursor isatan A (resp. isatan B) during the drying process suggests a biogenetic relationship between these secondary indolic metabolites.
14. Further investigations are necessary to understand the complex network of indolic metabolism. Therefore, the concentrations of other indolic compounds [glucosinolates or alkaloids like indolin-2-one (**14**, see chapter 1.3.2.)] had to be taken into account.

Literaturverzeichnis

21. Literaturverzeichnis

- Abe, F., Mori, Y., Yamauchi, T., Saiki, Y., **1988**. Strophantidin glycosides from the roots of *Apocynum venetum* var. basikurumon (Studies on *Apocynum*. II). *Chem. Pharm. Bull.*, *36* (10), 3811-3815.
- Andersson, C., Andersson T., Molander, M., **1991**. Ethanol absorption across human skin measured by in vivo microdialysis technique. *Acta Derm. Venereol.*, *71*, 389-393.
- Andersson, C., Andersson T., Molander, M., **1992**. In vivo microdialysis estimation of histamine in human skin. *Skin Pharmacol.*, *5*, 177-183.
- Andersson, C., Andersson T., Wardell, K., **1994**. Changes in skin circulation after insertion of a microdialysis probe visualized by laser Doppler perfusions imaging. *J. Invest. Dermatol.*, *102* (5), 807-811.
- Andersson, C., Wardell, K., Andersson, C., **1995**. Human in vivo cutaneous microdialysis: estimation of histamin release in cold urticaria. *Acta Derm. Venereol.*, *75*, 343-347.
- Angelini, L. G., Campeol, E., Tozzi, S., Gilbert, K.G., Cooke, D.T., John, P., **2003**. A new HPLC-ELSD method to quantify indican in *Polygonum tinctorium* L. and to evaluate β -glucosidase hydrolysis of indican for indigo production. *Biotechnol. Prog.*, *19*, 1792-1797.
- Averbeck D., Averbeck, S., Blais, J., Moysan, A., Huppe, G., Moliere, P., Prognon, P., Vigny, P., Dubertret, L., **1989**. Suction blister fluid: its use for pharmacodynamic and toxicological studies of drugs and metabolites in vivo in human skin after topical or systemic administration. In: *Models in Dermatology*. Maibach, H.I., Lowe, N.J. (Hrsg.), Karger, Basel, Schweiz, 5-11.
- Bartling, D., Seedorf, M., Schmidt, R.C., Weiler, E.W., **1994**. Molecular characterisation of two cloned nitrilases from *Arabidopsis thaliana*: key enzymes in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic-acid. *Plant Biol.*, *91*, 6021-6025.
- Beijerinck, M.W., **1899**. On the production of indigo from woad (*Isatis tinctoria*). *Nature*, *61*, 71-72.
- Benfeldt, E., Serup, J., **1999**. Effect of barrier perturbation on cutaneous penetration of salicylic acid in hairless rats: in vivo pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function. *Arch. Dermatol. Res.*, *291* (9), 517-526.

- Benfeldt, E., Serup, J., Menne, T., **1999a**. Effect of barrier pertubation on cutaneous salicylic acid penetration in human skin: in vivo pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function. *Br. J. Derm.*, 140, 739-748.
- Benfeldt, E., Serup, J., Menne, T., **1999b**. Microdialysis vs. suction blister technique for in vivo sampling of pharmacokinetics in the human dermis. *Acta Derm. Venereol.*, 79, 338-342.
- Bennett, C.F., Chiang, M.Y., Monia, B.P., Crooke, S. T., **1993**. Regulation of 5-lipoxygenase-activating protein expression in HL-60 cells. *J. Biochem.*, 289, 33-39.
- Benthin, B., Danz, H., Hamburger M., **1999**. Pressurized liquid extraction (PLE) of medicinal plants. *J. Chromatogr. A*, 837; 211-219.
- Berkeley, C., **1961**. Indigotin content in woad. *Nature*, 191, 1414-1415.
- Bito, L., Davson, H., Levin, E.M., Murray, M., Snider, N., **1966**. The concentration of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate in brain and in blood plasma of dog. *J. Neurochem.*, 13, 1057-1067.
- Blank, I.H., **1965**. Cutaneous barriers. *J. Invest. Dermatol.*, 4, 249-256.
- Bronaugh, R.L., Stewart, R.F., Congdon, E.R., **1982**. Methods for in vitro percutaneous absorption studies II: Animal models for human skin. *Toxikol. Appl. Pharmacol.*, 62, 481-488.
- Bronaugh, R.L., Stewart, R.F., **1984**. Methods for in vitro percutaneous absorption studies III: hydrophobic compounds. *J. Pharm. Sci.*, 73 (9), 1255-1258.
- Bronaugh, R.L., Stewart, R.F., **1985a**. Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: the flow-through diffusion cell. *J. Pharm. Sci.*, 74 (1), 64-67.
- Bronaugh, R.L., Stewart, R.F., **1985b**. Methods for in vitro percutaneous absorption studies V: permeation through damaged skin. *J. Pharm. Sci.*, 74 (10), 1062-1066.
- Bronaugh, R.L., Stewart, R.F., **1986**. Methods for in vitro percutaneous absorption studies VI: preparation of the barrier layer. *J. Pharm. Sci.*, 75 (5), 487-491.

- Bronaugh, R.L., Stewart, R.F., Simon, M., **1986**. Methods for in vitro percutaneous absorption studies VI: use of excised human skin. *J. Pharm. Sci.*, 75 (11), 1094-1097.
- Bronaugh, R.L., Hood, H.L., Kraeling, M.E.K., Yourick, J.J., **1999**. Determination of percutaneous absorption by in vitro techniques. In: *Percutaneous Absorption Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*. Bronaugh, R.L., Maibach, H.I. (Hrsg.), 3. Ausgabe, Marcel Dekker Verlag, New York, Basel, 229-233.
- Bronaugh, R.L., Maibach H.I. (Hrsg.), **2002**. Topical absorption of dermatological products. Marcel Dekker Verlag New York, Basel.
- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. (Hrsg.), **1974**. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 8. Ausgabe, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Calis, I., Yürüker, A., Rügger, H., Wright, A.D., Sticher, O., **1993**. Anatosides: Five novel acyclic monoterpene glycosides from *Viburnum orientale*. *Helv. Chim. Acta*, 76, 416-424.
- Choi, B.K., Gusev, A.I., Hercules, D.M., **1999**. Postcolumn introduction of an internal standard for quantitative LC-MS- analysis. *Anal. Chem.*, 71, 4107-4110.
- Clough, G.F., Boutsiouki, P., Church, M.K., Michel, C.C., **2002**. Effects of blood flow on the in vivo recovery of a small diffusible molecule by microdialysis in human skin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 302 (2), 681-686.
- Crespi, C.L., Miller, V.P., Penman, B.W., **1997**. Microtiter plate assays for inhibition of human, drug-metabolizing cytochromes P450. *Anal. Biochem.*, 248, 188-190.
- Danz, H., **2000**. Untersuchungen zur antiinflammatorischen Wirkung und zur Analytik von Tryptanthrin in *Isatis tinctoria* L., Dissertation Jena.
- Danz, H., Stoyanova, S., Hamburger, M., Brattström, A., **2000**. Identification and isolation of the COX-2 inhibitory principle in *Isatis tinctoria* L.. *Arch. Pharm. Suppl.*, 333 (1), 11.

- Danz, H., Stoyanova, S., Wippich, P., Brattström, A., Hamburger, M., **2001**. Identification and isolation of the cyclooxygenase–2 inhibitory principle in *Isatis tinctoria* L. *Planta Med.*, 67, 411-416.
- Danz, H., Baumann, D., Hamburger, M., **2002a**. Quantitative determination of the dual COX-2 / 5-LOX inhibitor tryptanthrin in *Isatis tinctoria* by ESI-LC-MS. *Planta Med.*, 68, 152-157.
- Danz, H., Stoyanova, S., Thomet, O., Simon, H.U., Dannhardt, G., Ulbrich, H., Hamburger M., **2002b**. Inhibitory activity of tryptanthrin on prostaglandin and leukotriene synthesis. *Planta Med.*, 68, 875-880.
- Delgado, J.M.R., DeFeudis, F.V., Roth, R.H., Ryugo, D.K., Mitruka, B.M., **1972**. Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 198, 9-21.
- Elias, P.M., Goerke, J., Friend, D.S., **1977**. Mammalian epidermal barrier lipids: composition and influence on structure. *J. Invest. Dermatol.*, 69, 535-546.
- Elias, P.M., **1983**. X-ray diffraction analysis of stratum corneum membrane couplets. *J. Invest. Dermatol.*, 80, 213-214.
- Elias, P.M., Menon, G.K., **1991**. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv. Lipid Res.*, 24, 1-26.
- Elliott, M.C., Stowe, B.B., **1970**. A novel sulphonated natural indole. *Phytochemistry*; 9, 1629-1632.
- Epstein, E., Nabors, M.W., Stowe, B.B., **1967**. Origin of indigo of woad. *Nature*, 216, 547-549.
- Fiehn, O., **2002**. Metabolomics – the link between genotyps and phenotyps. *Plant Mol. Biol.*, 48, 155-171.
- Franz, T.J., **1975**. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *J. Invest. Dermatol.*, 64, 190-195.

- Franz, T.J., **1978**. The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. *Curr. Probl. Dermatol.*, 7, 58-68.
- Fréchal, A., Fabre, N., Péan, C., Montaut, S., Fauvel, M.T., Rollin, P., Fouraste, I., **2001**. Novel indole-type glucosinolates from woad (*Isatis tinctoria* L.). *Tetrahedron Lett*, 42, 9015-9017.
- Friedländer, P., Roschdestwensky, N., 1915. Über ein Oxidationsprodukt des Indigoblaus. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 48, 1841-1847.
- George, V., Koshy, A.S., Singh, O.V., Nayar, M.N.S., Pushpangadan, P. **1996**. Tryptanthrin from *Wrightia tinctoria*. *Fitoterapia*, 67, 53-54.
- Gerhäuser, C., Klimo, K., Heiss, E., Neumann, I., Gamal-Eldeen, A., Knauf, J., Liu, G.-Y., Sitthimonchai, S., Frank, N., **2003**. Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res.*, 523-524, 163-172.
- Gerhäuser, C., You, M., Liu, J., Moriarty, R.M., Hawthorne, M., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M., **1997**. Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res.*, 57, 272-278.
- Gering, B., Junior, P., Wichtl, M., **1987**. Iridoid glycosides from *Penstemon confertus*. *Phytochemistry*, 26(11), 3011-3013.
- Gilbert, K.G., Garton, S., Karam, M.A., Arnold, G.M., Karp, A., Edwards, K.J., Cooke, D.T., Barker, J.H.A., **2002**. A high degree of genetic diversity is revealed in *Isatis* spp. (dyer's woad) by amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Theor. Appl. Genet.*, 104, 1150-1156.
- Gilbert, K.G., Hill, D.J., Crespo, C., Mas, A., Lewis, M., Rudolph, B., Cooke, D.T., **2000**. Qualitative analysis of indigo precursors from woad by HPLC and HPLC-MS. *Phytochem. Anal.*, 11, 18-20.
- Goetz, J.K., Schraudolf, H., **1983**. Two natural indol glucosinolates from Brassicaceae. *Phytochemistry*, 22, 905 – 907.

- Gottlob, A., Abels, C., Landthaler, M., Szeimies, R.M., **2002**. Die kutane Mikrodialyse-Anwendung in der Dermatologie. *Hautarzt*, *53*, 174-178.
- Groth, L. **1998**. Cutaneous microdialysis. A new technique for the assessment of skin penetration. *Curr. Probl. Dermatol.*, *26*, 90-98.
- Groth, L., Serup, J., **1998**. Cutaneous microdialysis in man: Effects of needle insertion trauma and anaesthesia on skin perfusion, erythema and skin thickness. *Acta Derm. Venereol.*, *78*, 5-9.
- Groth, L., Jorgensen, A., Serup, J., **1998**. Cutaneous microdialysis in the rat: Insertion trauma and effect of anaesthesia studied by laser Doppler perfusion imaging and histamin release. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, *11*, 125-132.
- Guo, Y., Chen, F., **1986**. TLC-UV spectrophotometric and TLC-scanning determination of isatin in leaves of *Isatis*. *Zhongcaoyao*, *17*, 8-11.
- Guy, R.H., Hadgraft, J., **1989**. Structure-activity correlations in percutaneous absorptions. In: *Percutaneous absorption: Mechanisms – Methodology – Drug Delivery*. Bronaugh, R.L., Maibach, H.I. (Hrsg.), 2. Auflage, Marcel Dekker Verlag, New York, 95-109.
- Hänsel, R., Sticher, O., Steinegger, E., **1999**. Pharmakognosie – Phytopharmazie. 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin.
- Hamburger, M., **2002**. *Isatis tinctoria* – From a rediscovery of an ancient medicinal plant towards a novel anti-inflammatory phytopharmaceutical. *Phytochem. Rev.*, *1*, 333-344.
- Hamburger, M., Danz, H., Medicament for inhibiting NF- κ B. WO 00/61159.
- Hamburger, M., Danz, H., Dittmann, K., **2002**. HPLC-based discovery of biologically active natural products. *Screening – Trends in drug discovery*, *3*, 32-35.
- Hannedouche, S., Jacquemond-Collet, I., Fabre, N., Stanislas, E., Moulis, C., **1999**. Iridoid keto-glycosides from *Caryopteris x Clandonensis*. *Phytochemistry*, *51*, 767-769.
- Hartleb, I., Seifert, K., **1994**. A novel anthranilic acid derivative from *Isatis tinctoria*. *Planta Med.*, *60*, 578 – 579.

- Hartleb, I. Seifert, K., **1995**. Acid constituents from *Isatis tinctoria*. *Planta Med.*, 61, 95 – 96.
- Heiss, E., Herhaus, C., Klimo, K., Bartsch, H., Gerhäuser, C., **2001**. Nuclear factor κ B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 276 (34), 32008-32015.
- Heinemann, C., Schliemann-Willers, S., Oberthür, C., Hamburger, M., Elsner, P., **2004**. Prevention of experimentally induced irritant contact dermatitis by extracts of *Isatis tinctoria* compared to pure tryptanthrin and its impact on UVB-induced erythema. *Planta Med.*, in press.
- Honda, G., Tosiriuk, V., Tabata M., **1980**. Isolation of an antidermatophytic tryptanthrin, from indigo plants, *Polygonum tinctorium* and *Isatis tinctoria*. *Planta Med.*, 38, 275-276.
- Hoogewerff, S., Ter Meulen, H., **1900**. Contribution to the knowledge of indican. *Proc. Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap.*, 2, 520-525.
- Hosoe, T., Nozawa, K., Kawahara, N., Fukushima, K., Nishimura, K., Miyaji, M., Kawai, K.-i., **1999**. Isolation of a new potent cytotoxic pigment along with indigotin from the pathogenic basidiomycetous fungus *Schizophyllum commune*. *Mycopathologia*, 146, 9-12.
- Hurry, J.B., **1930**. The woad plant and its dye. *Oxford University Press*, London.
- Index Kewensis, **1997**. Oxford University Press, London.
- Ishihara, T., Kohno, K., Ushio, S., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M., **2000**. Tryptanthrin inhibits nitric oxide and prostaglandin E₂ synthesis by murine macrophages. *Eur. J. Pharmacol.*, 407, 197-204.
- Iwagawa, T., Hase, T., **1989**. Iridoid glycosides from *Viburnum suspensum*. *Phytochemistry*, 28(9), 2393-2396.

- Jahodar, L., Hanus, V., Turecek, F., **1986**. Ethyl- β -D-erythro-D-glycero-hexopyranos-3-uloside, an isolation artefact from the roots of *Arctostaphylos uva-ursi* cv. *Arbuta*. *Pharmazie*, **41**, 7.
- Junior, P., **1984**. Serrulosid und Serrulatosid, zwei neue Iridoidglykoside aus *Penstemon serrulatus*. *Planta Med.*, **50**(5), 414-420.
- Kim, S.U., Song, K.S., Jung, D.S., Chae, Y.A., Lee, H.J., **1996**. Production of indoxyl derivatives in indole-supplemented tissue cultures of *Polygonum tinctorium*. *Planta Med.*, **62**, 54-56.
- Kokobun, T., Edmonds, J., John, P., **1998**. Indoxyl derivatives in woad in relation to medieval indigo production. *Phytochemistry*, **49**, 79-87.
- Kovar, A., Nolting, A., Derendorf, H., **1997**. Mikrodialyse zur Bestimmung freier Arzneistoffe in Geweben. *Pharmazie in unserer Zeit*, **26** (1), 17-23.
- Liu, J.H., Zschocke, S., Reininger, E., Bauer, R., **1998**. Inhibitory effects of *Angelica pubescens* f. *biserrata* on 5-lipoxygenase and cyclooxygenase. *Planta Med.*, **64**, 525-529.
- Lockwood, G.B., Belkhiri, A., 1991. Glucosinolate spectrum of some Algerian crucifers. *Pl. Syst. Evol.*, **176**, 11-20.**
- Marcinek, H., Weyler, W., Deus-Neumann, B., Zenk, M.H., **2000**. Indoxyl-UDPG-glucosyltransferase from *Baphicacanthus cusia*. *Phytochemistry*, **53**, 201-207.
- Martinez, M.S., Gutierrez Hurtado, B., Colino Gandarillas, C.I., Martinez Lanao, J., Sanchez-Navarro, A., **2002**. *In vitro* study of experimental factors affecting the microdialysis results. *Anal. Chim. Acta.*, **459**, 143-150.
- Maugard, T., Enaud, E., Choisy, O., Legoy, M.D., **2001**. Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (woad). *Phytochemistry*, **58**, 897-904.
- Maugard, T., Enaud, E., De la Sayette, A., Choisy, O., Legoy, M.D., **2002**. β -glucosidase-catalyzed hydrolysis of indican from leaves of *Polygonum tinctorium* L. *Biotechnol. Prog.*, **18**, 1104-1108.

- Meyer, O., **1995**. Waidgärung: <http://www.uni-bayreuth.de/forschungsberichte/94/pde95013114.html>.
- Mikkelsen, M.D., Hansen, C.H., Wittstock, U., Halkier, B.A., **2000**. Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J. Biol. Chem.*, 275(43), 33712-33717.
- Minami, Y., Nishimura, O., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Matsubara, H., **2000**. Tissue and intracellular localisation of indican and the purification and characterisation of indican synthase from indigo plants. *Plant Cell Physiol.*, 41(2), 218-225.
- Moghim, H.R., Barry, B.W., Williams, A.C., **1999**. Stratum corneum and barrier performance. A model lamellar structural approach. In: *Percutaneous Absorption Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*. Bronaugh, R.L., Maibach, H.I. (Hrsg.), 3. Ausgabe, Marcel Dekker Verlag New York, Basel, 515-553.
- Molina, P. Tarraga, A., Gonzalez-Tejero, A., Rioja, I., Ubeda, A., Terencio, M.C., Alcaraz, M.J., **2001**. Inhibition of leucocyte functions by the alkaloid isaindigotone from *Isatis indigotica* and some new synthetic derivatives. *J. Nat. Prod.*, 64, 1297 – 1300.
- Morgan, C.J., Renwick, A.G., Friedmann, P.S., **2003**. The role of stratum corneum and dermal microvascular perfusion in penetration and tissue levels of water-soluble drugs investigated by microdialysis. *Br. J. Derm.*, 148, 434-443.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Schäfer-Korting, M., **1996**. Arzneimittelwirkungen. 7. Ausgabe, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Normanly, J., Cohen, J.D., Fink, G.R., **1993**. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Biochemistry*, 90, 10355-10359.
- Oberthür, C., Hamburger, M., **2004b**. Tryptanthrin content in *Isatis tinctoria* leaves – a comparative study of selected strains and post-harvest treatments. *Planta Med.*, submitted.
- Oberthür, C., Heinemann, C., Elsner, P., Benfeldt, E., Hamburger, M., **2003**. A comparative study on the skin penetration of pure tryptanthrin and tryptanthrin in *Isatis tinctoria* extract by dermal microdialysis coupled with isotope dilution ESI-LC-MS. *Planta Med.*, 69, 385-389.

- Oberthür, C., Hoffmann, B., Hamburger, M., **2002**. Synthesis of d-tryptanthrin. *Pharmazie*, 8, 586-87.
- Oberthür, C., Schneider, B., Graf, H., Hamburger, M., **2004a**. The elusive indigo precursors in woad (*Isatis tinctoria* L.) – Identification of the major indigo precursor, isatan A, and a structure revision of isatan B. *Chem. Biodiv.*, 1, 174-182.
- Padden, A.N., Dillon, V.M., John, P., Edmonds, J., Collins, M.D., Alvarez, N., **1998**. *Clostridium* used in mediaeval dyeing. *Nature*, 396, 225.
- Padden, A.N., Dillon, V.M., Edmonds, J., Collins, M.D., Alvarez, N., John, P., **1999**. An indigo-reducing moderate thermophile from a woad vat, *Clostridium isatidis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 1025-1031.
- Perkin, A.G., **1907**. Constituents of natural indigo. Part II. *J. Chem. Soc.*, 435-440.
- Perkin, A.G., Bloxam, P., **1907**. Constituents of natural indigo. Part I. *J. Chem. Soc.*, 279-280.
- Rasku, S., Wähälä, K., **2000**. Synthesis of d₆-Daidzein. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.*, 43, 849-854.
- Rasku, S., Wähälä, K., Koskimies, J., Hase, T., **1999**. Synthesis of isoflavonoid deuterium labelled polyphenolic phytoestrogens. *Tetrahedron*, 55, 3445-3454.
- Raynaud, J., Prum, N., **1980**. Sur la presence d'Isoscoparine dans les graines d'*Isatis tinctoria* L. *Pharmazie*, 35, 712-713.
- Recio, M.C., Hamburger, M., Rios, J.L., **2002**. In vivo anti-inflammatory activity of *Isatis tinctoria* extracts and tryptanthrin. Abstract book 50th Annual Congress of Society of Medicinal Plant Research 2002. Canigüeral S, editor. Carlet (Valencia): CITA Publicaciones y Documentacion., S. 94.
- Reifenrath, G., Lee, B., Wilson, D.R., Spencer, T.S., **1994**. Comparison of in vitro skin-penetration cells. *J. Pharm. Sci.*, 83 (9), 1229-1233.

- Rhenius, M., Porzel, A., Diettrich, B., Luckner, M., **1997**. 21^h-Di-dehydro-deacetylloside C, a biotransformation product of deacetylloside C from senescent shoot cultures of *Digitalis lanata*. *Phytochemistry*, 44(6), 1061-1064.
- Riviere, J.E., Monteiro-Riviere, N., Williams, P., **1995**. Isolated perfused porcine skin flap as an in vitro model for predicting transdermal pharmacokinetics. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 41, 152-162.
- Roche Lexikon Medizin, 2. Auflage, Verlag Urban und Schwarzenberg, München 1984/1987.
- Rothmaler, W., **1994**. Exkursionsflora von Deutschland, Band 2 Gefäßpflanzen. Gustav Fischer Verlag Jena, Deutschland.
- Rougier, A., Lotte, C., Maibach, H.I., **1999**. In vivo relationship between percutaneous absorption and transepidermal water loss. In: *Percutaneous Absorption Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*. Bronaugh, R.L., Maibach, H.I. (Hrsg.), 3. Ausgabe, Marcel Dekker Verlag New York, Basel, 117-132.
- Saito, K., Morita, S., Kasai, Z., **1984**. Synthesis of L(+) tartaric acid from 5-keto-D-gluconic acid in *Pelargonium*. *Plant Cell Physiol.*, 25, 1223-1232.
- Surber, C., Schwarb, F.P., Smith, E.W., **1999**. Determination of percutaneous absorption by in vitro techniques. In: *Percutaneous Absorption Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*. Bronaugh, R.L., Maibach, H.I. (Hrsg.), 3. Ausgabe, Marcel Dekker Verlag New York, Basel, 395-409.
- Sandmeyer, T. 1919. Isonitrosoacetanilides and their condensation to isatin derivatives. *Helvetica Chimica Acta*, 2, 234-242.
- Scheuplein, R.J., **1965**. Mechanism of percutaneous absorption. 1. Routes of penetration and the influence of solubility. *J. Invest. Dermatol.*, 45, 334-346.
- Schnetz, E., Fartasch, M., **2000**. Microdialysis for the evaluation of penetration through the human skin barrier – a promising tool for future research? *Eur. J. Pharm. Sci.*, 1, 1-9.
- Schraudolph, H., **1968**. Untersuchungen zur Biogenese von Isatan B, der Indigovorstufe auf der Färberwaid (*Isatis tinctoria* L.). *Z. Naturforsch.*, 23b, 572-573.

- Schunck, E., **1855**. On the formation of indigo blue Part I. *Phil. Mag.*, *10*, 73-95.
- Smolen, G., Bender, J., **2002**. Arabidopsis cytochrome P450 *cyp83B1* mutations activate the tryptophan biosynthetic pathway. *Genetics*, *160*, 323-332.
- Stowe, B.B., Epstein, E., Vendrell, M., **1968**. Indoles of maize and the source of woad indigo. *Soc. Chem. Ind. London*, *31*, 102-110.
- Strobel, J., Gröger, D., **1989**. Über das Vorkommen von Indigovorstufen in *Isatis*-Species. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, *184*, 321-327.
- Takei, Y, Kunikata, T., Aga, M., Inoue, S., Ushio, S., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M., **2003**. Tryptanthrin inhibits interferon- γ production by Peyer's patch lymphocytes derived from mice that had been orally administered staphylococcal enterotoxin. *Biol. Pharm. Bull.*, *26* (3), 365-367.
- Tang, W. Eisenbrandt, G., **1992**. Chinese drugs of plant origin. Springer, Berlin.
- Ungerstedt, U., **1984**. Measurement of neurotransmitter release by intracranial dialysis. In: *Measurement of neurotransmitter release in vivo*. Marsden, C.A. (Hrsg.), John Wiley and Sons Ltd., New York, 81-105.
- Volc, J., Sedmera, P., Halada, P., Daniel, G., Prikrylova, V., Haltrich, D., **2002**. C-3 oxidation of non-reducing sugars by a fungal pyranose dehydrogenase: spectral characterisation. *J. Mol. Catal. B* *17*, 91-100.
- Wu, X., Qin, G.W., Cheung, K.K., Cheng, K.F., **1997a**. New alkaloids from *Isatis indigotica*. *Tetrahedron*, *53*, 13323 – 13328.
- Wu, X., Liu, Y., Sheng, W., Sun, J., Qin, G., **1997b**. Chemical constituents of *Isatis indigotica*. *Planta Med.*, *63*, 55 – 57.
- Xia, Z., Zenk, M.H., **1992**. Biosynthesis of indigo precursors in higher plants. *Phytochemistry*, *31*, 2695-2697.

Yamauchi, T., Abe, F., Wan, A.S.C., **1987**. Studies on *Cerbera*. IV. Polar cardenolide glycosides from the leaves of *Cerbera odollam* and *Cerbera manghas*. *Chem. Pharm. Bull.*, 35(12), 4813-4818.

Yoshikawa, M., Murakami, T., Kishi, A., Sakurama, T., Matsuda, H., Nomura, M., Matsuda, H., Kubo, M., **1998**. Novel indole S,O-bidesmoside, calanthoside, the precursor glycoside of tryptanthrin, indirubin, and isatin, with increasing skin blood flow promoting effects, from two *Calanthe* species (Orchidaceae). *Chem. Pharm. Bull.*, 46 (5), 886-888.

Zhu, Y.P., **1998**. Chinese Materia Medica. Harwood Academic, Amsterdam.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AcCN	Acetonitril
amu	atom mass units (atomare Masse-Einheit)
ASE	Accelerated Solvent Extraction / beschleunigte Lösungsmittlextraktion
AU	Absorption Units / Absorptionseinheiten
ber.	berechnet
bzw.	beziehungsweise
BuOH	Butanol
ca.	circa
CHCl ₃	Chloroform
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan / Methylenchlorid
CO ₂	Kohlendioxid
CYP 1a	Cytochrom P450, Unterfamilie 1a
d.h.	das heißt
DAD	Diode Array Detector
DC	Dünnschichtchromatogramm bzw. Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector (Messung der Lichtstreuung)
ESI LC – MS	Electrospray Ionisation Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
et al.	et alii / und andere
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
F ₂₅₄	Fluoreszenzindikator 254 nm
Fig.	Figur
getr.	getrocknet
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Hochleistungsflüssigchromatographie
HPLC – MS	High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
HClO ₄	Perchlorsäure

IC ₅₀	inhibition concentration (50 %)
i.d.	Innendurchmesser
iNOS	induzierbare Stickoxidsynthase
IS	Interner Standard
isoton.	isotonisch
kDa	Kilo – Dalton
Kap.	Kapitel
LAF	Laminar flow box
LC – MS	syn. HPLC – MS
LM	Laufmittel
log P	Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten P
LOX	Lipoxygenase
LPLC	Low Pressure Liquid Chromatography
M	molar
mAU	milli Absorption Units / milli Absorptionseinheiten
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min.	Minute
MS	Mass Spectrometry / Massenspektrometrie bzw. Massenspektrometer
NH ₄ CH ₃ COO	Ammoniumacetat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO	Stickstoffmonoxid
QR	Quinonreduktase / Chinonreduktase
redest.	redestilliert
RP	Reversed Phase / Umkehrphase
RP – HPLC	Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography
RP – LPLC	Reversed Phase – Low Performance Liquid Chromatography
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.u.	siehe unten
SC	Säulenchromatographie
sec. / s	Sekunde
SFE	Supercritical Fluid Extraction / Extraktion mit überkritischen Gasen
SLS	Sodium Lauryl Sulfate (Natriumlaurylsulfat)

s.o.	siehe oben
steady state	Gleichgewichtszustand
Str.	Stratum
Tab.	Tabelle
TPA	Phorbolester
t _R	Retentionszeit
UV	ultraviolett
UV / Vis	Ultraviolett / Visible
WDH	Wiederholung
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Abkürzungen der Waidherkünfte:

TW	Thüringer Waid
JW	Jenaer Waid
KW	Kieler Waid
FW	Französischer Waid
SW	Schweizer Waid

Zeichnung <i>Isatis tinctoria</i> :	Lindman, Carl Axel Magnus, 1901-1905 . „Bilder ur Nordens Flora“
Schema Hautaufbau:	<i>www.healthandage.com [Juli 2002]</i>
Foto Waidanbau Dornburg:	Prof. Dr. M. Hamburger

1. Veröffentlichungen in Zeitschriften

Oberthür, C., Hoffmann, B., Hamburger, M., **2002**. Synthesis of d-tryptanthrin. *Pharmazie*, 8, 586-87.

Oberthür, C., Heinemann, C., Elsner, P., Benfeldt, E., Hamburger, M., **2003**. A comparative study on the skin penetration of pure tryptanthrin and tryptanthrin in *Isatis tinctoria* extract by dermal microdialysis coupled with isotope dilution ESI-LC-MS. *Planta Med.*, 69, 385-389.

Oberthür, C., Schneider, B., Graf, H., Hamburger, M., **2004**. The elusive indigo precursors in woad (*Isatis tinctoria* L.) – Identification of the major indigo precursor, isatan A, and a structure revision of isatan B. *Chem. Biodiv.*, 1, 174-182.

Oberthür, C., Hamburger, M., **2004**. Tryptanthrin content in *Isatis tinctoria* leaves – a comparative study of selected strains and post-harvest treatments. *Planta Med.*, submitted.

Mitautor:

De Boni, S., Oberthür, C., Hamburger, M., Scriba, G. K. E., **2004**. Analysis of aspartyl peptide degradation products by high-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1022, 95-102.

Heinemann, C., Schliemann-Willers, S., Oberthür, C., Hamburger, M., Elsner, P., **2004**. Prevention of experimentally induced irritant contact dermatitis by extracts of *Isatis tinctoria* compared to pure tryptanthrin and its impact on UVB-induced erythema. *Planta Med.*, in press.

2. Vorträge

Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung (Barcelona, September 2002):

C. Oberthür, C. Heinemann, P. Elsner, M. Hamburger, E. Benfeldt,

“A subcutaneous microdialysis method combined with ESI-LC–MS analysis for studying the skin penetration of tryptanthrin in *Isatis* extracts”.

Forum Färberpflanzen (Dornburg, Mai 2004):

C. Oberthür, B. Schneider, H. Graf, M. Hamburger,

„Entdeckung neuer Indigovorstufen im Färberwaid (*Isatis tinctoria* L.) und deren Gehalt in Abhängigkeit von Erntezeitpunkt und Nacherntebehandlung“.

3. Poster

Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (Frankfurt / Main, Februar 2002):

Poster 1:

C. Oberthür, C. Heinemann, P. Elsner, M. Hamburger,

„An ESI-LC-MS method for the quantitative analysis of tryptanthrin in skin microdialysis samples”.

Poster 2:

C. Oberthür, B. Hoffmann, M. Hamburger,

“Synthesis of *d*-tryptanthrin”.

Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung (Barcelona, September 2002):

C. Oberthür, B. Hoffmann and M. Hamburger,

„Synthesis of d-tryptanthrin as an internal standard for quantitative LC – MS analysis”.

Jahrestagung der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung (Kiel, September 2003):

C. Oberthür, B. Schneider, H. Graf, M. Hamburger,

„Novel Indigo / Indirubin Precursors in *Isatis tinctoria* L.“.

Fachtagung für Arznei-und Gewürzpflanzen (Jena, September 2004)

Abstracts sind eingereicht für zwei Posterbeiträge:

Poster 1:

C. Oberthür, M. Hamburger,

„Einfluss von Erntezeitpunkt und Nacherntebehandlung auf das Inhaltsstoffspektrum indolischer Sekundärmetabolite im Färberwaid (*Isatis tinctoria* L.) – Quantifizierung des anti-inflammatorisch wirksamen Tryptanthrin“.

Poster 2:

C. Oberthür, H. Graf, M. Hamburger,

„Einfluss von Erntezeitpunkt und Nacherntebehandlung auf das Inhaltsstoffspektrum indolischer Sekundärmetabolite im Färberwaid (*Isatis tinctoria* L.) – Quantifizierung der Indigo-Vorstufen Isatan A, Isatan B und Indican“.

Anhang

Inhaltsverzeichnis Anhang

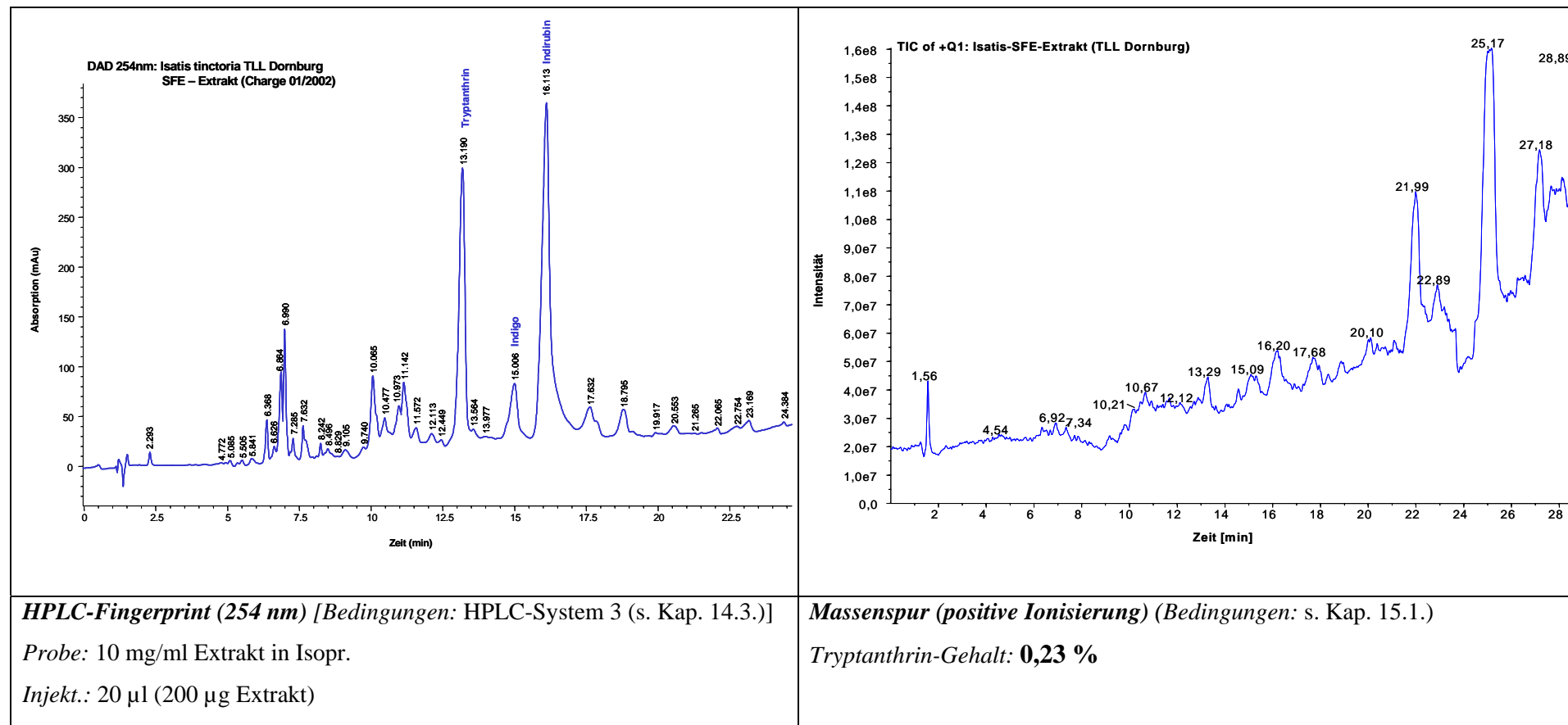
1.	Charakterisierung der verwendeten Extrakte.....	II
2.	Charakterisierung von synthetisierten Verbindungen.....	V
3.	Charakterisierung der Synthesezwischenprodukte der d ₈ -Tryptanthrinsynthese.	IX
4.	NMR Daten Isatan A und Isatan B.....	X
5.	Gehaltsbestimmung von Isatan A, Isatan B, Indican, Tryptanthrin.....	XII

1. Charakterisierung der verwendeten Extrakte

SFE-Extrakt (Charge 01/2002)

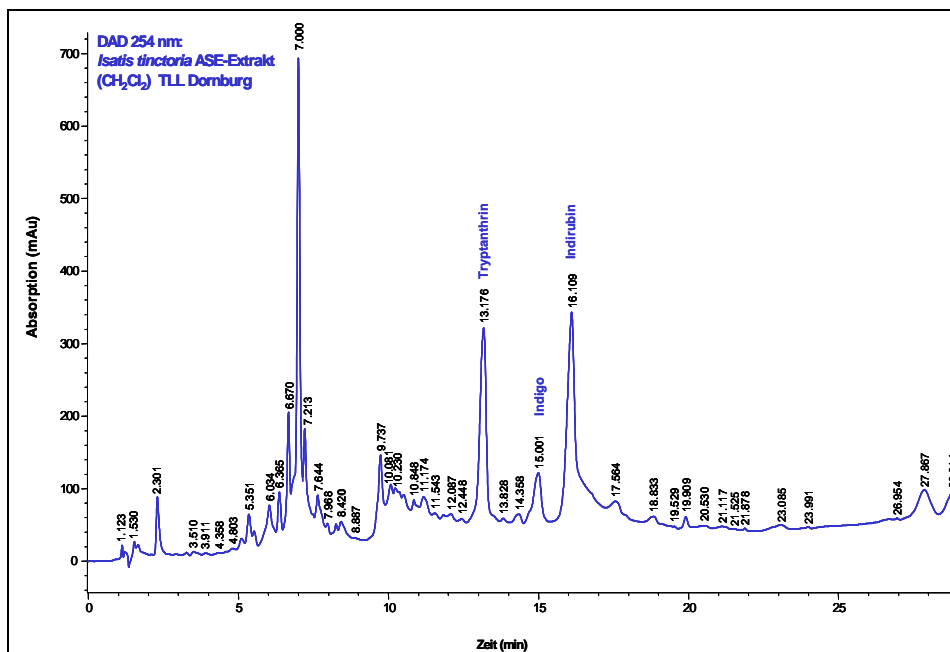
Verwendung: - Mikrodialyse (s. Kap. 3.)

- Mikrofraktionierung (s. Kap. 4.)



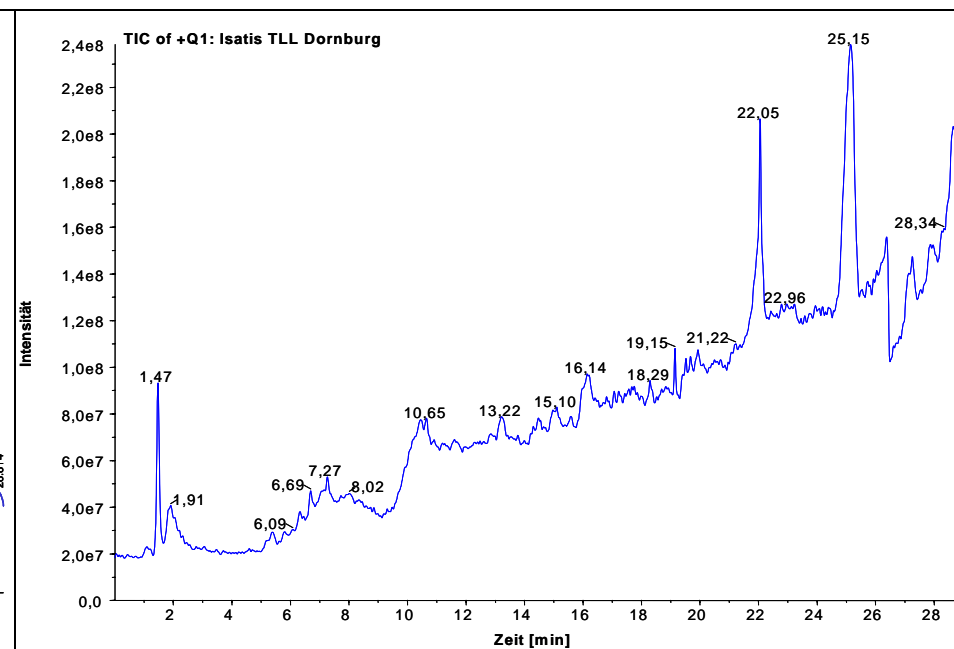
ASE-Extrakt (TLL Dornburg)

Verwendung: - Mikrofraktionierung (DKFZ)

**HPLC-Fingerprint (254 nm)** [Bedingungen: HPLC-System 3 (s. Kap. 14.3.)]

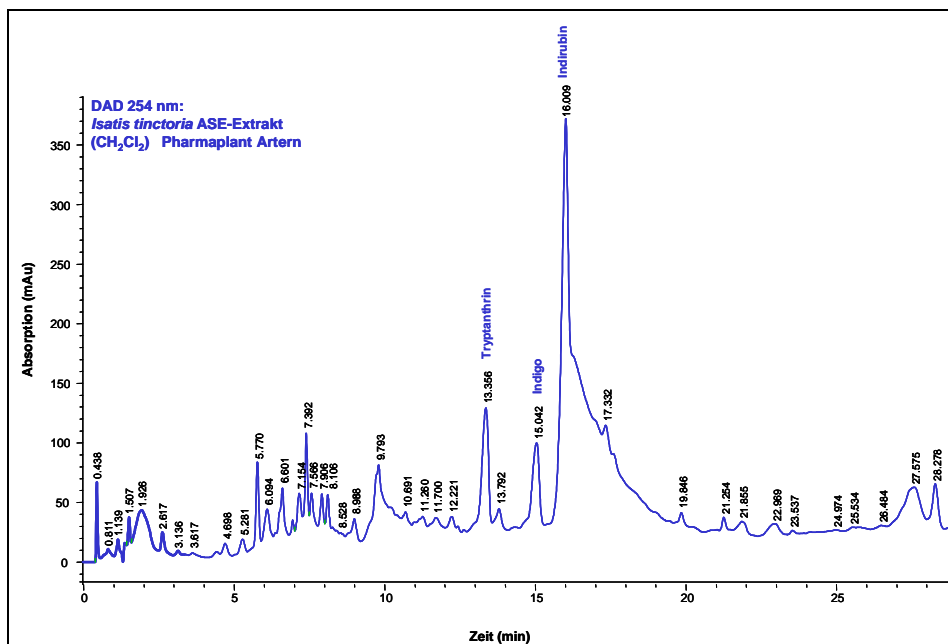
Probe: 10 mg/ml Extrakt in Isopr.

Injekt.: 20 µl (200 µg Extrakt)

**Massenspur (positive Ionisierung)** (Bedingungen: s. Kap. 15.1.)Tryptanthrin-Gehalt: **0,24 %**

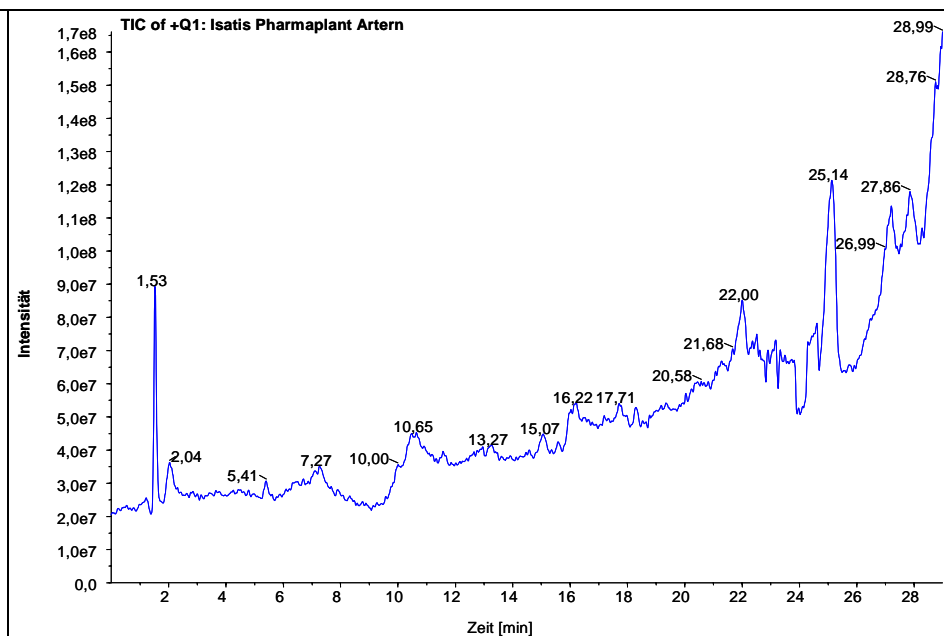
ASE-Extrakt (Pharmaplant Artern)

Verwendung: - Mikrofraktionierung (DKFZ)

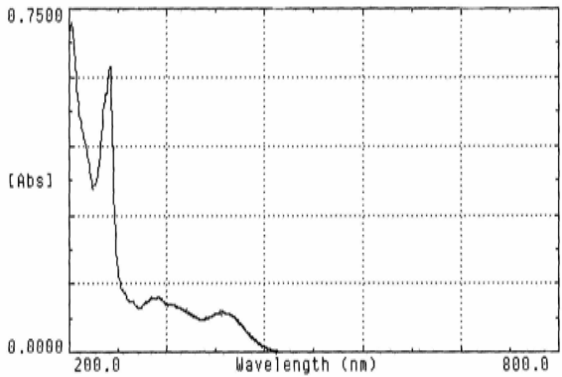
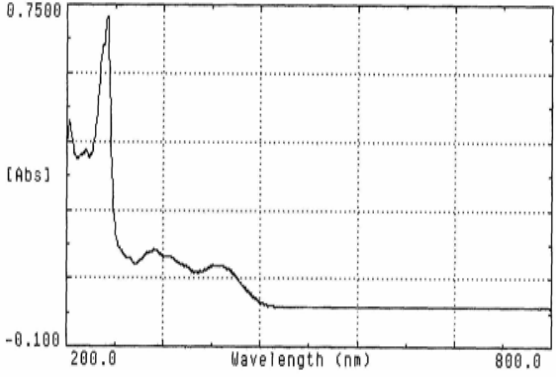
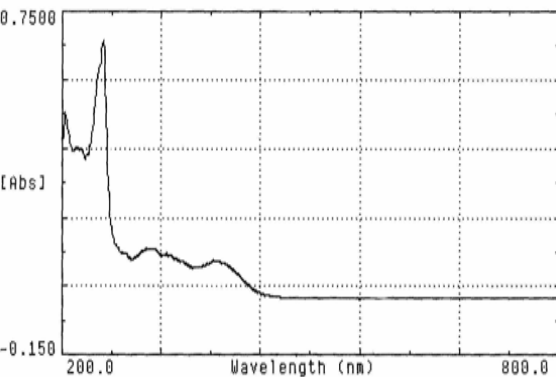
**HPLC-Fingerprint (254 nm)** [Bedingungen: HPLC-System 3 (s. Kap. 14.3.)]

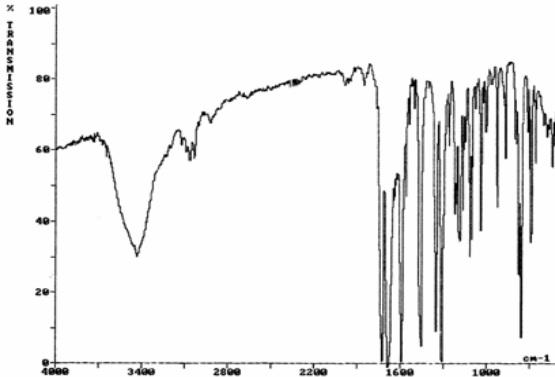
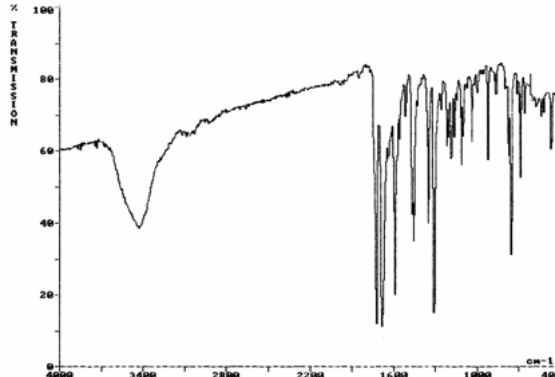
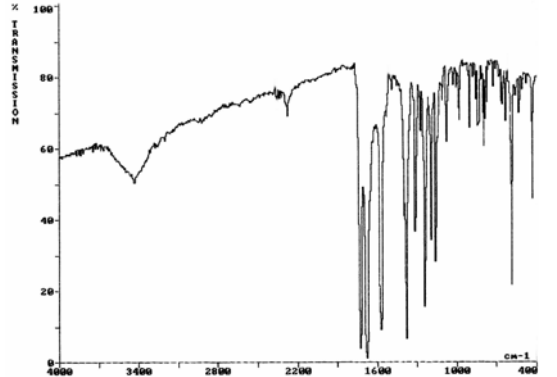
Probe: 10 mg/ml Extrakt in Isopr.

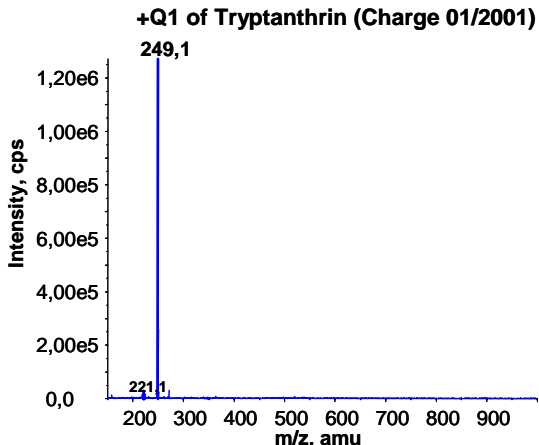
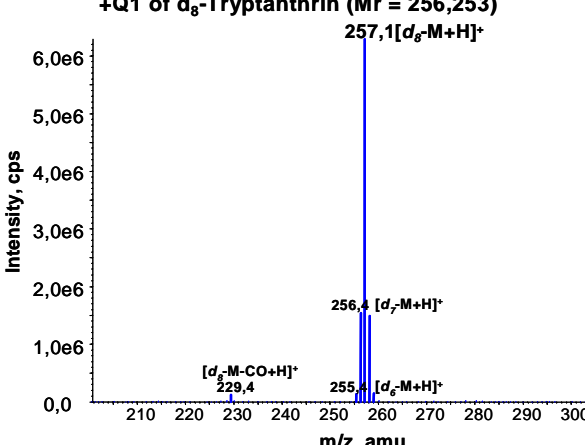
Injekt.: 20 µl (200 µg Extrakt)

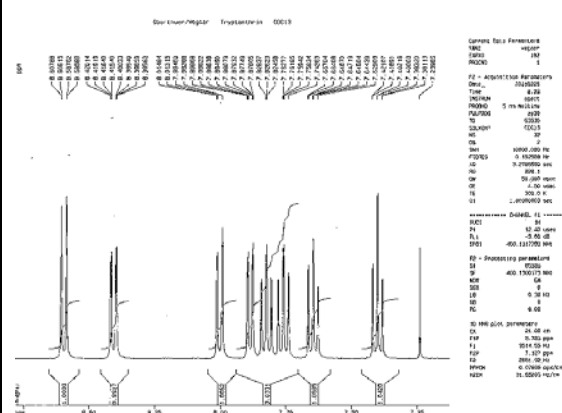
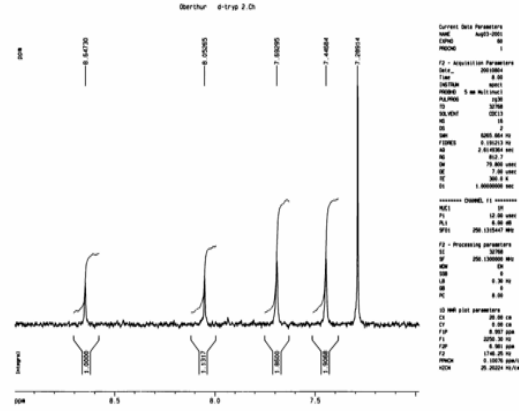
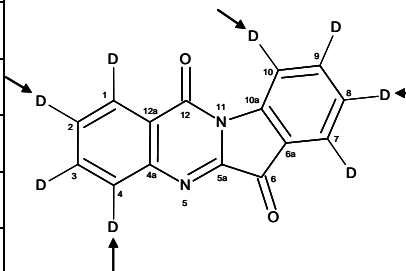
**Massenspur (positive Ionisierung)** (Bedingungen: s. Kap. 15.1.)Trypitanthrin-Gehalt: **0,11 %**

2. Charakterisierung von synthetisierten Verbindungen

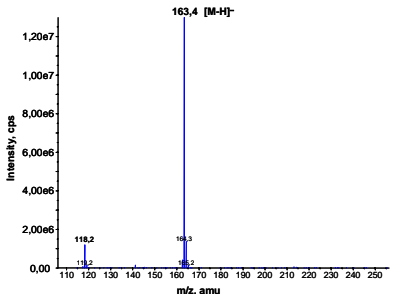
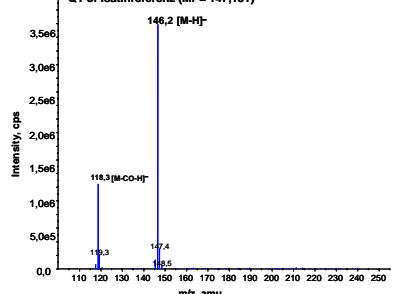
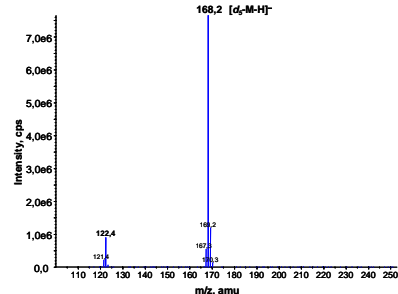
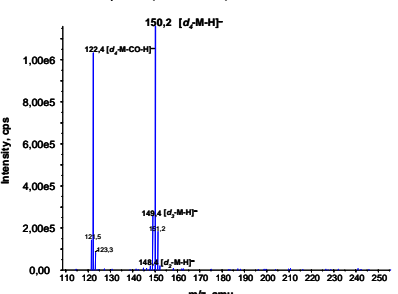
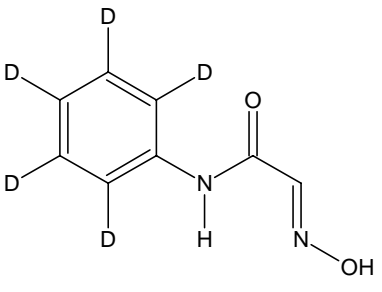
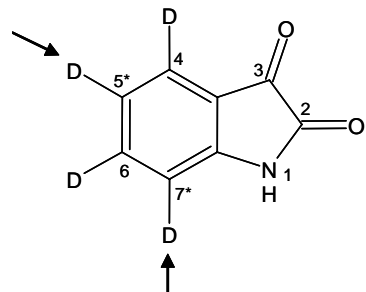
Tryptanthrinreferenz (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)	Tryptanthrin aus Eigensynthese (Charge 01/2001)	Deuteriertes Tryptanthrin
Schmelzpunkt: <i>Literatur:</i> 266-268°C (George et al. 1996) 268,1°C	269,8°C	271,3°C
UV-VIS-Spektrum: 		
λ_{\max} nm (log ϵ): 251 (4,60), 278 (3,58), 312 (3,88), 328 (3,82), 387 (3,74)	λ_{\max} nm (log ϵ): 251 (4,36), 278 (3,58), 312 (3,64), 328 (3,59), 387 (3,51)	λ_{\max} nm (log ϵ): 251 (4,60), 278 (3,86), 312 (3,88), 328 (3,82), 387 (3,74)

Tryptanthrinreferenz	Tryptanthrin aus Eigensynthese	Deuteriertes Tryptanthrin
<p data-bbox="165 308 360 339">IR-Spektrum:</p>  <p data-bbox="165 751 293 783"><i>Literatur:</i></p> <p data-bbox="165 788 237 820">C=O</p> <p data-bbox="165 825 472 857">1.) $\nu = 1730 \text{ cm}^{-1}$ (C-6)</p> <p data-bbox="165 861 488 893">2.) $\nu = 1700 \text{ cm}^{-1}$ (C-12)</p> <p data-bbox="165 922 658 954">Tryptanthrinreferenz (aufgenommen):</p> <p data-bbox="165 978 237 1010">C=O</p> <p data-bbox="165 1015 297 1046">1728 cm^{-1}</p> <p data-bbox="165 1051 297 1083">1688 cm^{-1}</p> <p data-bbox="165 1107 488 1139">C=C /aromatischer Ring</p> <p data-bbox="165 1160 378 1192">$1592 / 1456 \text{ cm}^{-1}$</p>	 <p data-bbox="786 970 857 1002">C=O</p> <p data-bbox="786 1007 918 1038">1725 cm^{-1}</p> <p data-bbox="786 1043 918 1075">1685 cm^{-1}</p> <p data-bbox="786 1099 1108 1131">C=C /aromatischer Ring</p> <p data-bbox="786 1152 1003 1184">$1595 / 1460 \text{ cm}^{-1}$</p>	 <p data-bbox="1426 970 1498 1002">C=O</p> <p data-bbox="1426 1007 1559 1038">1730 cm^{-1}</p> <p data-bbox="1426 1043 1559 1075">1680 cm^{-1}</p> <p data-bbox="1426 1099 1749 1131">C=C /aromatischer Ring</p> <p data-bbox="1426 1152 1559 1184">1575 cm^{-1}</p>

Tryptanthrinreferenz	Tryptanthrin aus Eigensynthese	Deuteriertes Tryptanthrin
<p>Massebestimmung: (s. Kap. 15.1.)</p> <p><i>Referenzdaten:</i></p> <p>$M_r = 248,236 \text{ g/mol}$</p> <p>$249,1 \text{ [M+H]}^+$, $221,1 \text{ [M-CO+H]}^+$.</p>	<p>+Q1 of Tryptanthrin (Charge 01/2001)</p>  <p>Intensity, cps</p> <p>m/z, amu</p>	<p>+Q1 of d₈-Tryptanthrin ($M_r = 256,253$)</p>  <p>Intensity, cps</p> <p>m/z, amu</p>
		<p>*$\sum \text{Intensitäten} = 100\%$</p> <p>einzelne Intensitäten = x (n=3)</p> <p>257,1 amu $[\text{d}_8\text{-M+H}]^+$ 77,5 %</p> <p>256,4 amu $[\text{d}_7\text{-M+H}]^+$ 20,7 %</p> <p>255,4 amu $[\text{d}_6\text{-M+H}]^+$ 1,8 %</p>

Tryptanthrinreferenz		Tryptanthrin aus Eigensynthese		Deuteriertes Tryptanthrin	
NMR-Spektren: (¹ H-NMR)					
C-H	δ _H (J in Hz) Referenz	δ _H (J in Hz) Tryptanthrin (01/2001)	δ _H (J in Hz) d-Tryptanthrin	<div>Rücktauschpositionen:</div> 	
1	8.43, dd, 7.91	8.41, dd, 7.92			
2	7.68, m, 7.98; 15.18	7.64, m, 7.59; 14.59	7,69 (s)		
3	7.86, m, 7.31; 15.38	7.83, m, 7.31; 15.38			
4	8.03, d, 8.10	8.00, d, 8.10	8,05 (s)		
7	7.91, d 7.58	7.90, d, 7.55			
8	7.43, m, 7.57; 15.12	7.40, m, 7.56; 15.11	7,45 (s)		
9	7.80, m 8.04; 15.68	7.76, m, 8.06; 15.68			
10	8.62, d 8.11	8.60, d, 8.10	8,65 (s)		

3. Charakterisierung der Synthesezwischenprodukte der d_8 -Tryptanthrinsynthese

Parameter	d_5 -Isonitrosoacetanilid	d_4 -Isatin
Aussehen	beige Kristallplättchen	oranges Präzipitat
Schmelzpunkt (n=3)	175-179°C	193-197°C
ESI-MS 1. Massen der undeuterten Referenzen	<p>-Q1 of Isonitrosoacetanilidreferenz (Mr = 164,161)</p> 	<p>-Q1 of Isatinreferenz (Mr = 147,131)</p> 
2. Massen der deuterierten Verbindungen	<p>-Q1 of d_5-Isonitrosoacetanilid (Mr = 169,172)</p>  <p>m/z 168,2 [d_5-M-H]⁻ (100%)</p>	<p>-Q1 of d_4-Isatin (Mr = 151,139)</p>  <p>m/z 150,2 [d_4-M-H]⁻ (80,0%) m/z 149,4 [d_3-M-H]⁻ (18,3%) m/z 148,4 [d_2-M-H]⁻ (1,7%)</p>
IR (KBr)	$\nu = 3296, 1666, 1610, 1530, 1456, 1388, 1339, 1234, 1000 \text{ cm}^{-1}$	$\nu = 3432, 3185, 1721, 1604, 1166, 591 \text{ cm}^{-1}$
UV / VIS (in Methanol)	$\delta_{\text{max}} = 212, 274 \text{ nm}$	$\delta_{\text{max}} = 208, 241, 295 \text{ nm}$
$^1\text{H-NMR}$	(CH_3OD) $\delta = 7,55 \text{ (s, H-8)}$	(DMSO-d_6) $\delta = 6,92 \text{ (d, } J = 2,8 \text{ Hz, H-7)}, 7,10 \text{ (d, } J = 2,8 \text{ Hz, H-5)}$
Struktur / Rücktauschpositionen		

4. NMR Daten Isatan A und Isatan B

^{13}C (125.75 MHz) und ^1H -NMR (500.13 MHz) Daten von Isatan B (**1**), Isatan A (**2**) und Isatan B-Hydrat (**3**). J in Hz.

	1		1		3		2	
	δ (C)	δ (H)	δ (C)	δ (H) ¹	δ (C)	δ (H)	δ (C)	δ (H)
	DMSO- d_6		D ₂ O		D ₂ O		DMSO- d_6	
H–N(1)	10.61 (<i>brs</i>)						10.62 (<i>brs</i>)	
H–C(2)	111.3	7.13 (<i>d</i> , $J = 2.6$)	112.8	6.56	112.0	6.53 (<i>s</i>)	111.6	7.11 (<i>d</i> , $J = 2.6$)
C(3)	136.6		135.7		136.3		136.4	
C(3a)	119.5		119.3		119.2		119.5	
H–C(4)	117.3	7.55 (<i>d</i> , $J = 7.9$)	117.3	7.06	117.3	7.06 (<i>d</i> , $J = 8.2$)	117.3	7.54 (<i>d</i> , $J = 7.9$)
H–C(5)	118.2	6.96 (<i>ddd</i> , $J = 7.9, 7.1, 1.0$)	119.5	6.50	119.3	6.48 (<i>dd</i> , $J = 8.2, 7.1$)	118.3	6.96 (<i>ddd</i> , $J = 7.9, 7.1, 1.0$)
H–C(6)	121.5	7.05 (<i>ddd</i> , $J = 8.2, 7.1, 1.2$)	122.6	6.59	122.6	6.58 (<i>dd</i> , $J = 8.2, 7.1$)	121.5	7.05 (<i>ddd</i> , $J = 8.2, 7.1, 1.2$)
H–C(7)	111.5	7.29 (<i>d</i> , $J = 8.2$)	112.1	6.80	112.0	6.78 (<i>d</i> , $J = 8.2$)	111.6	7.28 (<i>d</i> , $J = 8.2$)
C(7a)	133.3		133.5		133.4		133.2	
H–C(1')	104.8	4.76 (<i>d</i> , $J = 8.0$)	104.8	4.29	103.0	4.33 (<i>d</i> , $J = 8.1$)	104.7	4.77 (<i>d</i> , $J = 8.0$)
H–C(2')	76.5	4.30 (<i>ddd</i> , $J = 8.0, 6.2, 1.8$)	76.5	3.88	73.8	2.99 (<i>d</i> , $J = 8.1$)	76.6	4.31 (<i>m</i>)

OH(2')	5.72 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.2)						5.78 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.2)	
C(3')	206.0		206.2		94.4		205.0	
H-C(4')	72.2	4.15 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 10.3, 6.0, 1.8)	72.0	3.77	70.2	2.93 (<i>d</i> , <i>J</i> = 10.1)	72.4	4.22 (<i>brd</i> , <i>J</i> = 10.3)
OH(4')	5.43 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.0)						5.47 (<i>brd</i> , <i>J</i> = 5.0)	
H-C(5')	76.7	3.37 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 10.3, 6.3, 1.8)	76.1	2.87	75.3	2.96 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 10.1, 5.1, 1.9)	73.7	3.66 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 10.3, 6.3, 1.7)
H-C(6'a)	} 60.8	3.78 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 12.0, 5.3, 1.8)	} 60.5	3.19	} 60.8	3.10 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 12.5, 5.1)	} 63.1	} 4.29 (<i>m</i> , 2H)
H-C(6'b)		3.61 (<i>m</i>)		3.32		3.24 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 12.5, 1.9)		
OH(6')	4.90 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 6.4, 5.3)							
H-C(1'')							168.4	
H-C(2''a)							} 45.6	3.04 (<i>d</i> , <i>J</i> = 14.1)
H-C(2''b)								3.08 (<i>d</i> , <i>J</i> = 14.1)
C(3'')							168.5	

¹ Multiplizitäten und Kopplungskonstanten entsprechen denen von Isatan B-Hydrat (**3**) in D₂O.

5. Gehaltsbestimmung von Isatan A, Isatan B, Indican, Tryptanthrin

Isatan A und Isatan B (nur in gefriergetrockneten Proben („L“) nachweisbar)

Probe	Isatan A (µg) in 200 µg Extrakt	Isatan A (mg) je 1 g Droge TM	Isatan A (%) im TM	Isatan A (mg) je 1 g Droge FM	Isatan A (%) im FM
TW0602-L	60,33	94,85	9,49	9,96	1,00
JW0602-L	72,03	80,96	8,10	8,83	0,88
KW0602-L	2,01	2,54	0,25	0,30	0,03
FW0602-L	11,5	17,15	1,72	1,73	0,17
SW0602-L	76,63	101,98	10,20	10,61	1,06
TW0802-L	68,12	98,77	9,88	9,09	0,91
JW0802-L	57,83	67,53	6,75	6,41	0,64
KW0802-L	20,23	25,57	2,56	2,63	0,26
FW0802-L	69,45	84,50	8,45	7,94	0,79
SW0802-L	34,28	43,39	4,34	4,04	0,40

Probe	Isatan B (µg) in 200 µg Extrakt	Isatan B (mg) je 1 g Droge TM	Isatan B (%) im TM	Isatan B (mg) je 1 g Droge FM	Isatan B (%) im FM
TW0602-L	0,27	0,42	0,04	0,04	0,004
JW0602-L	0,25	0,28	0,03	0,03	0,003
KW0602-L	0,57	0,72	0,07	0,09	0,009
FW0602-L	1,81	2,70	0,27	0,27	0,027
SW0602-L	0,34	0,45	0,05	0,05	0,005
TW0802-L	0,70	1,02	0,10	0,09	0,009
JW0802-L	1,86	2,17	0,22	0,21	0,021
KW0802-L	0,04	0,05	0,01	0,01	0,001
FW0802-L	0,33	0,40	0,04	0,04	0,004
SW0802-L	0,16	0,20	0,02	0,02	0,002

Indican Juni 2002

Probe	Indican (µg) in 200 µg Extrakt	Indican (mg) je 1 g Droge TM	Indican (%) im TM	Indican (mg) je 1 g Droge FM	Indican (%) im FM
TW0602-L	2,80	4,40	0,44	0,46	0,05
JW0602-L	4,62	5,19	0,52	0,57	0,06
KW0602-L	5,34	6,74	0,67	0,81	0,08
FW0602-L	4,85	7,23	0,72	0,73	0,07
SW0602-L	2,93	3,90	0,39	0,41	0,04
TW0602-RT	11,58	16,60	1,66	1,83	0,18
JW0602-RT	13,27	15,61	1,56	1,69	0,17
KW0602-RT	17,71	23,96	2,40	2,75	0,28
FW0602-RT	12,16	16,14	1,61	1,65	0,16
SW0602-RT	13,27	18,50	1,85	2,04	0,20
TW0602-40°C	25,76	24,71	2,47	2,37	0,24
JW0602-40°C	26,59	26,71	2,67	2,64	0,26
KW0602-40°C	22,01	23,49	2,35	2,40	0,24
FW0602-40°C	12,26	11,96	1,20	1,18	0,12
SW0602-40°C	29,23	29,48	2,95	2,86	0,29

Indican August 2002

Probe	Indican (µg) in 200 µg Extrakt	Indican (mg) je 1 g Droge TM	Indican (%) im TM	Indican (mg) je 1 g Droge FM	Indican (%) im FM
TW0802-L	6,14	8,90	0,89	0,82	0,08
JW0802-L	6,59	7,70	0,77	0,73	0,07
KW0802-L	5,46	6,90	0,69	0,71	0,07
FW0802-L	3,18	3,87	0,39	0,36	0,04
SW0802-L	4,51	5,71	0,57	0,53	0,05
TW0802-RT	23,63	27,28	2,73	2,70	0,27
JW0802-RT	24,23	31,47	3,15	3,43	0,34
KW0802-RT	11,70	15,13	1,51	1,60	0,16
FW0802-RT	19,15	20,59	2,06	2,14	0,21
SW0802-RT	23,34	31,15	3,12	3,27	0,33
TW0802-40°C	12,25	10,81	1,08	0,89	0,09
JW0802-40°C	23,46	19,46	1,95	1,83	0,18
KW0802-40°C	8,19	7,47	0,75	0,69	0,07
FW0802-40°C	24,09	21,49	2,15	2,08	0,21
SW0802-40°C	24,82	22,38	2,24	2,19	0,22

Tryptanthrin in CH₂Cl₂ – ASE Extrakten (2001 und 2002)

Die Tryptanthrin-Gehalte sind auf den Extrakt berechnet.

Thüringer Waid

Erntezeit	Extraktgehalt (%) (gefriergetr. Blätter)	Extraktgehalt (%) (Raumtemp.-getr. Blätter)	Extraktgehalt (%) (40°C-getr. Blätter)
07-2001	0,04	0,072	0,282
08-2001	-----	0,173	0,183
06-2002	0,007	0,089	0,298
08-2002	0,009	0,158	0,191

Jenaer Waid

Erntezeit	Extraktgehalt (%) (gefriergetr. Blätter)	Extraktgehalt (%) (Raumtemp.-getr. Blätter)	Extraktgehalt (%) (40°C-getr. Blätter)
07-2001	0,034	0,059	0,233
08-2001	-----	0,178	0,333
06-2002	0,009	0,07	0,26
08-2002	0,015	0,183	0,201

Kieler Waid

Erntezeit	Extraktgehalt (%) (gefriergetr. Blätter)	Extraktgehalt (%) (Raumtemp.-getr. Blätter)	Extraktgehalt (%) (40°C-getr. Blätter)
07-2001	-----	0,067	0,229
08-2001	0,041	0,121	0,242
06-2002	0,015	0,103	0,237
08-2002	0,017	0,141	0,208

Französischer Waid

Erntezeit	Extraktgehalt (%) (gefriergetr. Blätter)	Extraktgehalt (%) (Raumtemp.-getr. Blätter)	Extraktgehalt (%) (40°C-getr. Blätter)
07-2001	0,055	0,105	0,247
08-2001	-----	0,182	0,407
06-2002	0,014	0,083	0,194
08-2002	0,008	0,132	0,232

Schweizer Waid

Erntezeit	Extraktgehalt (%) (gefriergetr. Blätter)	Extraktgehalt (%) (Raumtemp.-getr. Blätter)	Extraktgehalt (%) (40°C-getr. Blätter)
07-2001	-----	0,123	0,281
08-2001	-----	0,207	0,306
06-2002	0,012	0,077	0,247
08-2002	0,009	0,127	0,247

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Christine Oberthür
Geburtsort: Erfurt
Geburtsdatum: 18. November 1975
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1982-1990 Polytechnische Oberschule „Ernst Schneller“, Erfurt
1990-1994 Staatliches Gymnasium „Johann Gutenberg“, Erfurt
Abitur mit dem Prädikat „Sehr gut“

Studium:

1994-1998 Studium der Pharmazie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Abschluss des Studiums mit dem Prädikat „Gut“
1999-2000 Anfertigung einer Diplomarbeit in der Galenischen Entwicklung des
Arzneimittelwerkes Dresden mit dem Thema: „Untersuchung von
Einflüssen bei der Befilmung von Kernen am Glatt-Minicoater mit
Hilfe der statistischen Versuchsplanung“ (Prof. P. Kleinebudde).
Abschluss mit dem Prädikat „Gut“
2000 Approbation als Apothekerin und Diplom-Verteidigung an der Martin-
Luther-Universität Halle / Wittenberg
2000-2001 Angestellte Apothekerin in einer Erfurter Apotheke
2001-2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie, Lehrstuhl
Pharmazeutische Biologie, Universität Jena; Dissertation bei Prof. Dr.
M. Hamburger mit dem Thema: „Indolische Sekundärmetabolite in
Isatis tinctoria – Hautpenetration von Tryptanthrin und saisonale sowie
prozessbedingte Veränderungen der Inhaltsstoffmuster.“

Jena, den 04. April 2004

Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät im Zeitraum Januar 2001 bis März 2004 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Matthias Hamburger angefertigt.

Ich erkläre,

- dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe,
- dass die Arbeit weder teildentisch noch identisch mit einer Arbeit ist, die der Friedrich-Schiller-Universität Jena oder einer anderen Hochschule zur Erlangung des akademischen Grades oder als Prüfungsleistung vorgelegt worden ist und
- dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist.

Christine Oberthür

Jena, den 04. April 2004